



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA -
PPGBIOTEC**

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE FERRO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA VIA
HIPERTERMIA POR ONDAS CURTAS**

AYRLES SILVA GONÇALVES BARBOSA MENDONÇA

Manaus – AM

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE FERRO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA VIA
HIPERTERMIA POR ONDAS CURTAS**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Multi-institucional em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia,
na área de concentração da Saúde.**

AYRLES SILVA GONÇALVES BARBOSA MENDONÇA

Orientadora: Dra. Antônia Maria Ramos Franco - INPA

Co-orientador: PhD. Andriy Grafov – Universidade de Helsinki/FI

Manaus – AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M539d Mendonca, Ayrles Silva
Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas de Óxido de Ferro para o Tratamento de Leishmaniose Cutânea via Hipertermia por Ondas Curtas / Ayrles Silva Mendonca. 2017
128 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Antônia Maria Ramos Franco
Coorientador: Andriy Grafov
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Nanopartículas. 2. Hipertermia. 3. Leishmaniose. 4. Ondas Curtas. 5. Maghemita. I. Franco, Antônia Maria Ramos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos João Otávio e Maria Clara, por me fazerem tentar ser um exemplo melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as minhas conquistas e ensinamentos.

Agradeço aos meus pais (Jorge e Fátima), os quais nunca hesitaram em me apoiar e orientar, mesmo com a distância.

Ao meu esposo, Rannier, que sempre me ajudou, aconselhou e apoio, em qualquer circunstância.

Aos meus familiares (irmãos, sobrinhas, primos, primas, tios, tias...) pela compreensão e torcida.

Aos amigos mais próximos: Zé e Kercinha, pela torcida e apoio.

À Prof^ª. Antonia Franco, pelo apoio, conselho, compreensão, dedicação, paciência, orientação e confiança.

Ao Prof. Andriy, pelas orientações e apoio.

Aos Professores: José Carlos, Rodrigo, Andrea e Marco, pelas parcerias e suporte.

Aos colegas de trabalho, pelo apoio e compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Leishmaniose, em especial Meire, pelo auxílio nas técnicas e compreensão quanto aos contratempos.

À todos os meus professores, que mesmo inconscientemente me ensinaram algo e me transmitiram valores importantíssimos.

À Universidade de Helsinki/Finlândia e ao Projeto VAIKUTUS, por me permitirem realizar dois *Marie Curie Fellow* e fornecerem suporte financeiro e de infra-estrutura durante os mesmos.

À Universidade Federal do Amazonas e Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo suporte e infra-estrutura.

Enfim, agradeço à todos aqueles que me ajudaram, de uma forma ou de outra, a chegar ao fim do Doutorado. Obrigada à todos!

“Aquilo que os remédios não curam, cura o ferro; aquilo que o ferro não cura, cura o fogo;
aquilo que o fogo não cura é preciso considerá-lo irremediável”.

Hipócrates

Resumo

A leishmaniose é uma patologia que afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo mundo, sendo prevalente em 5 continentes e considerada endêmica em 98 países. A forma cutânea é a mais comum e pode ser causada por aproximadamente 20 espécies. No Brasil, o medicamento à base de antimônio é utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose. Após administração endovenosa, ele é rapidamente absorvido e praticamente 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48h pelos rins. Em consequência, faz-se indispensável a administração de doses elevadas, o que gera muitos efeitos colaterais, incluindo alterações cardiorrespiratórias e renais. Nesse sentido, o objetivo geral do presente trabalho constituiu-se como o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de maghemita puras e revestidas com ácido glicurônico e frutose, atrelado a aplicação de ondas curtas, visando a geração de um protocolo de tratamento inovador, via hipertermia, para o tratamento de lesões de leishmaniose cutânea. Para tanto, foram realizados, além da síntese das nanopartículas, ensaios de caracterização, que incluem, entre outros, microscopia de varredura, via FEG; difração de Raio-X; espectroscopia na região do infravermelho (FTIR); espectroscopia de Mössbauer e medidas magnéticas (ZFC). Ensaios de definição de parâmetro de ondas-curtas e ensaios de viabilidade celular *in vitro*, com e sem o uso de ondas curtas, também foram realizados. Os resultados do FEG revelaram uma estrutura bem ordenada de nanopartículas, com diâmetro médio na ordem de 60nm. Os dados de difração de raio-X, juntamente com Mössbauer, indicaram o estado de oxidação e fase cristalina do óxido de ferro compatível com uma amostra pura de maghemita. As medidas do FTIR indicaram adsorção dos ligantes às nanopartículas, sobretudo quando revestidas com ácido glicurônico. As medidas de magnetização por ZFC indicaram, em todas as amostras, propriedades magnéticas compatíveis com regime ferromagnético e magnetização de saturação entre 56 e 59 emu/g, indicando que esses materiais quando expostos à um campo eletromagnético alternado permitirão a hipertermia. Por fim, os ensaios *in vitro* indicaram um real efeito leishmanicida quando as nanopartículas puras ou revestidas foram expostas ao campo magnético alternado do ondas-curtas por 30 minutos, o que gerou hipertermia e consequente morte do patógeno. Diante do exposto, é possível concluir que a aplicação do método leishmanicida proposto indicou um alto potencial de utilização para o tratamento de lesões de leishmaniose cutânea via hipertermia por ondas-curtas com nanopartículas de maghemita.

Palavras-chaves: nanopartículas, maghemita, hipertermia, leishmaniose.

Abstract

Leishmaniasis is a disease that affects around 12 million people worldwide, being prevalent in 5 continents and considered endemic in 98 countries. The cutaneous form is the most common and can be caused by approximately 20 species. In Brazil, the antimony drug is used as the first choice in the treatment of leishmaniasis. After intravenous administration, it is rapidly absorbed and almost 90% of the antimony is excreted within the first 48 hours by the kidneys. As a consequence, the administration of high doses is indispensable, which generates many side effects, including cardiorespiratory and renal alterations. In this sense, the general objective of this work was the development of pure maghemite nanoparticles and coated with glucuronic and fructose acid, shortwave, aiming to generate an innovative treatment protocol, via hyperthermia for the treatment of cutaneous leishmaniasis lesions. In addition to the synthesis of nanoparticles, characterization tests were performed, including field emission gun microscopy (FEG); X-ray diffraction; Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR); Mössbauer spectroscopy and magnetic measurements (ZFC). Short-wave parameter definition tests and *in vitro* cell viability assays, with and without the use of short waves, were also performed. Results: The results of the FEG revealed a well ordered structure of nanoparticles, with an average diameter of 60nm. X-ray diffraction data, together with Mössbauer, indicated the oxidation state and crystalline phase of the iron oxide compatible with a pure sample of maghemite. The FTIR measurements indicated adsorption of the binders to the nanoparticles, especially when coated with glucuronic acid. The magnetization measurements by ZFC indicated, in all samples, magnetic properties compatible with ferromagnetic regime and saturation magnetization between 56 and 59 emu /g, indicating that these materials when exposed to an alternating electromagnetic field will allow hyperthermia. Finally, the *in vitro* assays indicated a real leishmanicidal effect when the pure or coated nanoparticles were exposed to the alternating magnetic field of the short waves for 30 minutes, which generated hyperthermia and consequent death of the pathogen. In view of the above, it is possible to conclude that the application of the proposed leishmanicide method indicated a high potential of use for the treatment of cutaneous leishmaniasis lesions

Keywords: nanoparticles, maghemite, hyperthermia, leishmaniasis.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico homem-vetor-hospedeiro vertebrado para o gênero <i>Leishmania</i>	23
Figura 2. Diferentes formas do gênero <i>Leishmania</i> no Ciclo biológico: (a) Forma flagelada ou promastigota; (b) Forma aflagelada ou amastigota.	24
Figura 3. Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	25
Figura 4. Imagens de diferentes lesões envolvendo leishmaniose cutânea e mucocutânea. (a): Leishmaniose Cutânea: Apresentando lesão clássica em moldura; (b): Leishmaniose Mucocutânea: Apresentando destruição do septo nasal; (c): Leishmaniose Cutânea: Apresentando lesões papulosas; (d): Leishmaniose Difusa e (e): Leishmaniose Mucocutânea: Apresentando lesão úmida em região nasal. Figura adaptada das Fontes: (LUPI, BARTLETT, <i>et al.</i> , 2009; GONTIJO e CARVALHO, 2003).	30
Figura 5. Estrutura química dos principais fármacos empregados na prática clínica para o tratamento da leishmaniose. Figura Adaptada de: (RATH, TRIVELIN, <i>et al.</i> , 2003)...	33
Figura 6. Escalas de comprimento mostrando o contexto nanômetro. A escala de comprimento no topo varia de 10^{-1} a 10^9 nm e ilustra o tamanho da bola de tênis comparada a molécula de água. Figura adaptada de: (THE ROYAL SOCIETY ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).	38
Figura 7. Cronologia de alguns fatos importantes na história da nanotecnologia. Figura adaptada de: (DURAN, MATTOSO e MORAIS, 2012).	40
Figura 8. Diagrama de fase binário Fe-O. Figura Adaptada de: (NOLDIN JUNIOR, 2007)..	47
Figura 9. Campo de Predominância da Wustita. Fonte: (NOLDIN JUNIOR, 2007).	48
Figura 10. Estrutura Cristalina Espinélio da Magnetita. Figura adaptada de: (COSTA, 2013).	49
Figura 11. Mecanismos básicos de Hipertermia mediante campo magnético alternado: (a) Esquema de indução para material magnético em uma bobina de corrente alternada; (b) e (c) Perda de energia por relaxação levando ao aquecimento em um campo oscilante; (b) Modo Néel; (c) Modo de relaxação Browniano. Figura adaptada de : (SOUZA, 2011).	52
Figura 12. Ilustração esquemática de estratégias terapêuticas usando nanopartículas magnéticas: hipertermia. Figura baseada em: (CASTRO e QUEIROZ, 2012).	53
Figura 13. Ilustração esquemática dos componentes básicos de um aparelho de ondas curtas. Figura baseada em: (PRENTICE, 2014).	56

Figura 14. Organograma metodológico. NP's= nanopartículas; NPP = solução de NP's de óxido de ferro sem revestimento (solução precursora); NPA3= NP's revestidas com ácido glicurônico na proporção 1:3 (Fe:Ácido); NPA5= NP's revestidas com ácido glicurônico na proporção 1:5 (Fe:Ácido); NPA10= NP's revestidas com ácido glicurônico na proporção 1:10 (Fe:Ácido);NPF3= NP's revestidas com frutose na proporção 1:3 (Fe:Frutose); NPF5= NP's revestidas com frutose na proporção 1:5 (Fe:Frutose); NPF10= NP's revestidas com frutose na proporção 1:10 (Fe:Frutose); DLS= <i>Dynamic Light Scattering</i> ; MEV/FEG=Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de elétrons; FTIR= <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ; VSM= <i>Vibrating Sample Magnetometry</i> ; TGA= <i>Thermogravimetric Analysis</i> (Análise Termogravimétrica); DSC= <i>Differential Scanning Calorimeter</i> (Calorimetria Exploratória Diferencial).	58
Figura 15. Imagem da solução final das nanopartículas de maghemita com seu respectivo processo de diálise e caráter magnético. NPOF= Nanopartículas de óxido de ferro.....	61
Figura 16. Fluxograma demonstrando a metodologia resumida de síntese das nanopartículas de maghemita.....	62
Figura 17. Microscópio eletrônico S-4800 HITACHI no momento da realização do ensaio..	65
Figura 18. Amostras preparadas para a microscopia eletrônica.	65
Figura 19. Preparação das soluções para análise no DR-X.....	66
Figura 20. (a): Aparelho de Difração de Raio-X, modelo X'Pert PRO da marca PANalytical. (b): Lâmina de vidro, contendo amostra do material, inserida no aparelho no momento do ensaio.....	67
Figura 21. Espectrômetro de Mössbauer (Marca: Wissel/Modelo: W304).	68
Figura 22. Espectrômetro de infravermelho (IR Trace Shimadzu).	69
Figura 23. SDT Q600 da TaInstruments.	70
Figura 24. Magnetômetro de Amostra Vibrante (Lakeshore).	70
Figura 25. Esquema do Sistema de monitoramento térmico, aquisição de dados e refrigeração do equipamento de magneto hipertermia.	72
Figura 26. Aparelho de ondas curtas com sincronia máxima (tunnigh).	73
Figura 27. Esquema da distribuição das soluções e controles no bioensaio de viabilidade celular em placas de 96 poços.	77
Figura 28. DLS da NPP (solução “precursora”) de NPOF.	79

Figura 29. Gráficos de intensidade versus tamanho de partículas, para as soluções de nanopartículas revestidas com ácido glicurônico.....	80
Figura 30. Gráficos de intensidade versus tamanho de partículas, para as soluções de nanopartículas revestidas com ácido glicurônico.....	81
Figura 31. (a): Imagem do MEV-FEG da solução precursora (NPP). (b): Histograma gerado pelo software ImageProPlus apresentando o diâmetro médio de partícula de 61, 58nm.	83
Figura 32. Imagens do MEV-FEG referentes as solução de nanopartículas revestidas com Ac. Glicurônico. (a)-NPA3: Imagem do MEV-FEG da solução de nanopartículas revestidas com Ac. Glicurônico na proporção 1:3 (NPA3); (b) -NPA3: Histograma gerado pelo software ImageProPlus da amostra NPA3, apresentando o diâmetro médio de partícula de 63, 24 nm; (c)-NPA5: Imagem do MEV-FEG da solução de nanopartículas revestidas com Ac. Glicurônico na proporção 1:5 (NPA5); (d) –NPA5: Histograma gerado pelo software ImageProPlus da amostra NPA5, apresentando o diâmetro médio de partícula de 61, 58 nm.	84
Figura 33. (a): Imagem do MEV-FEG da solução de nanopartículas revestida com frutose (NPF10). (b): Histograma gerado pelo software ImageProPlus apresentando o diâmetro médio de partícula de 65, 88 nm.....	85
Figura 34. Espectroscopia de Mössbauer para as amostras NPP; NPA3, NPA5 e NPF10.....	86
Figura 35. Difratoograma de Raio-X da amostra NPP lavada (a) e não lavada (b).	89
Figura 36. Difratoograma de Raio-X das amostras: NPA3 (c); NPA5 (d) e NPF10 (e).	91
Figura 37. Espectros de Infravermelho das Amostras NPP, NPA3, NPA5 e NPF10, além dos ligantes com a mesma concentração utilizada nas nanopartículas: ácido glicurônico e frutose.....	94
Figura 38. Destaque dos espectros de infravermelho para as amostras NPF10 e NPA5 em comparação com a amostra precursora (NPP), evidenciado a banda próximo a 1080 cm^{-1} , que corresponde à convolução dos picos de NH_4Cl e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	95
Figura 39. Destaque dos espectros de infravermelho para a amostra NPA3 em comparação com a amostra precursora (NPP) e ácido glicurônico.....	96
Figura 40. Gráficos dos resultados referentes às análises térmicas das amostras: (a) NPP; (b) NPA3; (c) NPA5 e (d)NPF10.....	99
Figura 41. Gráfico da análise térmica do ácido glicurônico P.A.....	100
Figura 42. Gráfico da análise térmica da frutose.....	101

Figura 43. Imagens das amostras após aquecimento no SDT: (a)NPP; (b)NPA3; (c)NPA5 e (d)NPF12.....	102
Figura 44. Fotografias demonstrando, em nível macroscópico, a magnetização das Amostras.	103
Figura 45. Curvas de magnetização versus campo magnético, em temperatura ambiente (300K), para todas as amostras (NPP, NPA3; NPA5 e NPF10).	104
Figura 46. Gráfico de hipertermia magnética, indicando pela variação de temperatura versus o tempo.....	106
Figura 47. Comparação entre a eficácia leishmanicida (E%) das diferentes amostras avaliadas (NPA3, NPA5, NPP e NPF10) e controle parasitário CP, com e sem a aplicação do OC.	114

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> relacionadas com suas formas clínicas e distribuição geográfica. Fonte adaptada: (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2014).....	22
Tabela 2. Incidência estimada de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (Adaptação ALVAR, VÉLEZ, et al., 2012).....	27
Tabela 3. Reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de maghemita.	60
Tabela 4. Reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido D-Glicurônico e D-Frutose.	62
Tabela 5. Soluções sintetizadas com ácido D-Glicurônico e D-Frutose, a partir de 30 mL da solução precursora de nanopartículas de óxido de ferro.	63
Tabela 6. Parâmetros hiperfinos dos espectros de Mössbauer medidos em 300 K.	87
Tabela 7. Ensaios de hipertermia com OC para amostra de NPP diluída na proporção 1:1 (100 µl de meio RPMI e 100 µl de NPP).	107
Tabela 8. Ensaios de hipertermia com OC para amostra de NPP diluída na proporção 1:3 (150 µl de meio RPMI e 50 µl de NPP).	107
Tabela 9. Ensaios de hipertermia com OC para amostra de NPP sem diluição (200 µl de NPP).	108
Tabela 10. Ensaios de hipertermia com OC para o meio RPMI (200 µl de meio).	108
Tabela 11. Dados gerais do bioensaio de Eficácia leishmanicida para todas as amostras de nanopartículas e todos os controles, sem e com o uso da hipertermia por ondas curtas.	110
Tabela 12. ANOVA TWO WAY entre os tratamentos propostos: nanopartículas e controle parasitário, com e sem o uso do ondas curtas.	110
Tabela 13. Apresentação dos dados de temperatura e pH para o bioensaio de viabilidade celular em todas as amostras de nanopartículas e todos os controles.	111
Tabela 14. Comparação entre as médias da eficácia leishmanicida entre as nanopartículas e Controle Parasitário (CP) com aplicação do ondas curtas.	112
Tabela 15. Comparação entre as médias da eficácia leishmanicida entre as nanopartículas e CP sem a aplicação do ondas curtas.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	- Adenosina Trifosfato
PBS	- <i>Phosphate Buffer Saline</i>
$C_6H_{10}O_7$	- Ácido D-Glicurônico
$C_6H_{12}O_6$	- D-Frutose
CFC	- Cúbica de Face Centrada
CMA	- Campo Magnético Alternado
Co	- Cobalto
CO ₂	- Dióxido de Carbono
DLS	- Dispersão Dinâmica de Luz
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DR-X	- Difração de Raios-X
DSC	- Calorimetria Exploratória Diferencial
E%	- Eficácia
EUA	- Estados Unidos da América
Fe	- Ferro
Fe ₃ O ₄	- Magnetita
FeCl ₃ .6H ₂ O	- Cloreto de Ferro III Hexahidratado
FeSO ₄ .7H ₂ O	- Sulfato de Ferro Heptahidratado
FTIR	- Espectroscopia de Infravermelho
IBM	- <i>International Business Machines</i>
ICDD	- <i>International Center for Diffraction Data</i>
IDRM	- Intradermoreação de Montenegro
IFI	- Imunofluorescência Indireta
JCPDS	- <i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>

LC	- Leishmaniose Cutânea
LCD	- Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	- Leishmaniose Mucocutânea
LT	- Leishmaniose Tegumentar
LTA	- Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	- Leishmaniose Visceral
MET	- Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	- Microscopia Eletrônica de Varredura por Canhão de Emissão de Elétrons
Mg	- Magnésio
NH ₄ OH	- Hidróxido de Amônio
Ni	- Níquel
NNN	- Novy, MacNeal e Nicolle
NP	- Nanopartícula
NP's	- Nanopartículas
NPA10	- Nanopartículas de Óxido de Ferro revestida com ácido glicurônico na proporção 1:10 (Fe: ácido)
NPA3	- Nanopartículas de Óxido de Ferro revestida com ácido glicurônico na proporção 1:3 (Fe: ácido)
NPA5	- Nanopartículas de Óxido de Ferro revestida com ácido glicurônico na proporção 1:5 (Fe: ácido)
NPF10	- Nanopartículas de Óxido de Ferro revestida com frutose na proporção 1:10 (Fe: frutose)
NPF3	- Nanopartículas de Óxido de Ferro revestida com frutose na proporção 1:3 (Fe: frutose)
NPF5	- Nanopartículas de Óxido de Ferro revestida com frutose na proporção 1:5 (Fe: frutose)

NPM	- Nanopartícula Magnética
NPM's	- Nanopartículas Magnéticas
NPOF	- Nanopartículas de Óxido de Ferro
NPP	- Nanopartículas de Óxido de Ferro sem revestimento (Solução precursora)
O	- Oxigênio
OC	- Ondas Curtas
OH	- Hidroxila
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PBS	- Soro Bovino Fetal
RFHT	- Terapia por Radiofrequência
Rh	- Ródio
RNA	- Ácido Ribonucleico
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
Sb ³⁺	- Antimônio Trivalente
Sb ⁵⁺	- Antimoniais Pentavalentes
SDT	- Análises Térmicas
SER	- Sistema Retículo Endotelial
SPM	- Superparamagnetismo
TGA	- Análise Termogravimétrica
Ti	- Temperatura Inicial
VSM	- Magnetometria de Amostra Vibrante
Zn	- Zinco
α -Fe ₂ O ₃	- Hematita
γ -Fe ₂ O ₃	- Maguemita

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. Leishmaniose.....	21
2.1.1. <i>Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)</i>	24
2.1.2. <i>Recursos Físicos como Tratamento Alternativo para Leishmaniose Tegumentar</i>	35
2.2. Nanotecnologia.....	37
2.3. Nanopartículas Magnéticas (NPM's)	40
2.3.1. <i>Metabolismos das Nanopartículas Magnéticas</i>	44
2.4. Óxido de Ferro	45
2.5. Hipertermia	50
2.7. Ondas Curtas	54
3. OBJETIVOS.....	57
3.1. Objetivo Geral.....	57
3.2. Objetivos Específicos	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1. ETAPA I: SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS	59
4.1.2. Síntese das Nanopartículas de Maghemita Revestidas	62
4.2. ETAPA II – CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	63
4.2.9. <i>Definição de Parâmetros para Hipertermia por Ondas Curta</i>	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÃO.....	116
REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto parasitárias, caracterizadas como protozoonoses, que acometem o homem e são causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, apresentando diferentes formas clínicas relacionadas à espécie envolvida. Em linhas gerais, a leishmaniose pode se apresentar como Leishmaniose Visceral/LV (vulgarmente conhecida como Calazar) e Leishmaniose Tegumentar/LT. A LT se subdivide em: Leishmaniose Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC) e Cutânea Difusa (LCD), podendo ser a LMC considerada uma variação da própria LC. Os vetores da leishmaniose são dípteros da família Psychodidae, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (ALVAR, VÉLEZ, *et al.*, 2012; FRANCO, GRAFOVA, *et al.*, 2016).

A partir de estudos patofisiológicos, baseado no ciclo evolutivo do parasita, foi verificado que a *Leishmania* se desenvolve no tubo intestinal do hospedeiro invertebrado, na forma promastigota, e essa, por sua vez, é introduzida nos mamíferos através da picada, transforma-se na forma amastigota. Enquanto a forma promastigota é flagelada e extracelular, a forma amastigota é intracelular e sem flagelo livre (ALVAR, VÉLEZ, *et al.*, 2012).

No Brasil, os compostos de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) foram, e permanecem sendo, os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose há mais de 70 anos. As formas moleculares dos complexos Sb^{+5} são aplicadas por via parenteral e comercializadas como estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®). Contudo, a resistência dos parasitas aos fármacos e a alta toxicidade dos mesmos, as quais provocam efeitos secundários graves; limita o uso de antimoniais, sobretudo em populações especiais, como crianças, idosos e indivíduos com baixa imunidade (FRANCO, GRAFOVA, *et al.*, 2016; BLANCO, COSSIO, *et al.*, 2013).

Dessa forma, devido aos problemas enfrentados com a terapia disponível, novos medicamentos e regimes de tratamento estão sendo estudados e tornados disponibilizados à sociedade (ALVAR, VÉLEZ, *et al.*, 2012). Dentre eles, a termoterapia por radiofrequência (*Radiofrequency-induced heat therapy - RFHT*), que consiste no emprego de calor para a destruição do patógeno, tem recebido especial atenção, mas demonstrando eficácia leishmanicida limitada, uma vez que apresenta maior efetividade em lesões de menores dimensões (em torno de 2 cm²), indicando que a RFHT pode não ser adequada para o tratamento de múltiplas lesões ou que apresentem grandes dimensões. Tal limitação, todavia,

não está diretamente associada ao aquecimento e sim ao modo de geração do mesmo (via radiofrequência), o qual possui limitações físicas para penetração tissular e requer anestesia local (LOPEZ, ROBAYO, *et al.*, 2012; SADEGHIAN, NILFROUSHZADEH e IRAJI, 2007; BUMB, PRASAD, *et al.*, 2013).

Outros recursos terapêuticos que estão sendo estudados e já apresentam resultados preliminares positivos tanto para doenças tropicais quanto para a área oncológica, são as terapias baseadas na nanobiotecnologia e suas mais variadas especificidades. Trata-se, portanto, da aplicação de materiais em escala nanométrica, os quais possibilitam a obtenção de novas propriedades físicas e químicas, determinadas pelo reduzido tamanho e aumento da razão área/volume (FRANCO, GRAFOVA, *et al.*, 2016; NAZIR, HUSSAIN, *et al.*, 2014; WANG, BILLONE e MULLETT, 2013).

Nesse sentido, nanopartículas (NP's) de óxidos de ferro têm sido amplamente investigadas, devido suas propriedades físicas, químicas e magnéticas, as quais permitem que elas sejam utilizadas em inúmeros segmentos da área biomédica, traduzidos por seu baixo perfil de toxicidade, superfície reativa e possibilidade de modificações com revestimentos biocompatíveis; além de possuírem a capacidade de geração de hipertermia, através da aplicação de um campo eletromagnético de alta frequência (PITAKSUTTEEPONG, 2016; WANG, BILLONE e MULLETT, 2013), o qual pode ser obtido pela utilização de um aparelho de ondas curtas (MESSIAS, OKUNO e COLACIOPPO, 2011).

Na fisioterapia, o equipamento mais utilizado para obtenção de termoterapia profunda (diatermia) é o ondas curtas (OC) (JUNAID, 1986; MONGE-MAILLO B, 2013). A diatermia por OC faz parte do campo dos geradores de alta frequência (27,12 MHz) e utiliza energia e campo eletromagnético para o emprego de calor profundo, apresentando como efeitos terapêuticos tradicionais a ação anti-inflamatória, analgésica, cicatricial, desconstruturante e hiperemiante (ZAVARIZE SF, 2014; COSTA, SALDANHA, *et al.*, 2009).

Diante do exposto, a justificativa para a execução do presente trabalho se baseou nas seguintes considerações: 1) O arsenal terapêutico para leishmaniose é restrito, apresentando elevada toxicidade e efeitos colaterais importantes; 2) As pesquisas atuais apontam a termoterapia (por calor) como um recurso terapêutico de eficácia leishmanicida comprovada; 3) A hipertermia magnética, com emprego de nanopartículas de óxido de ferro, vem sendo utilizada como um recurso terapêutico por aquecimento, sobretudo na área da oncologia e; 4) O aparelho de ondas curtas é um recurso termoterapêutico tradicional da fisioterapia que promove calor profundo nos tecidos, através da aplicação de energia e campo eletromagnético

alternado (SALUNKHE, KHOT e PAWAR, 2014; SILVA, OLIVEIRA, *et al.*, 2011; ALVAR, VÉLEZ, *et al.*, 2012; ARONSON, WORTMANN e BYRNE, 2010; LEVY, ALLOYEAU, *et al.*, 2011; PRENTICE, 2014).

Desse modo, o objetivo principal do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas de maghemita, revestidas com substâncias atóxicas e biocompatíveis (ácido glicurônico e frutose), associadas à hipertermia por ondas curtas, a fim de propor, em nível experimental, um novo método para o tratamento de lesões de leishmaniose cutânea. Para tanto, foram definidas como metas principais: (i) a síntese das nanopartículas (com e sem revestimentos); (ii) a caracterização morfológica, estrutural e magnética dessas nanopartículas e (iii) a avaliação da eficácia leishmanicida do método proposto, por meio de bioensaios *in vitro* em formas promastigotas do parasita.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma patologia provocada por um protozoário e transmitida por fêmeas de flebotomíneos, insetos vetores da família Psychodidae. Essa doença é caracterizada como uma zoonose negligenciada, uma vez que afeta prioritariamente os países pouco desenvolvidos, sendo, em muitos casos, ignorada nas discussões de prioridades para doenças tropicais (ABBAS, VINAY e NELSON, 2016). Contudo, ao contrário do que a etimologia da palavra “negligenciada” possa inferir, estima-se que pelo menos 12 milhões de pessoas estejam infectadas por leishmaniose, sendo prevalente em cinco continentes e considerada endêmica em 98 países (ALVAR, VÉLEZ, *et al.*, 2012).

Desde 1993 até os dias atuais, a Organização Mundial da Saúde considera a Leishmaniose como uma das doenças de importância pública, assumindo um segundo lugar na linha de problemas de saúde pública causadas por protozoário. Os estudos mais recentes estimam que, no mundo, a contagens de casos oficiais somam mais de 58.000 casos de leishmaniose visceral e 220 mil de leishmaniose tegumentar (formas cutâneas e mucocutâneas) por ano (OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE).

Como mencionado anteriormente, a leishmaniose se apresenta em duas formas distintas: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). A forma visceral é vulgarmente conhecida como Calazar e se caracteriza como uma doença parasitária letal, apresentando alterações sistêmicas importantes (SHARMA, SHAIKH, *et al.*, 2017). A forma tegumentar é caracterizada por lesões cutâneas, afetando o tecido epitelial e podendo ser subdividida em três principais formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). Dentre elas (formas tegumentares), a LC é a forma mais comum e pode ser causada por aproximadamente 20 espécies e, juntamente com a LMC, a qual pode ser considerada uma variação clínica da própria LC, são as mais temidas, pois produzem lesões destrutivas e desfigurantes em várias partes do corpo, inclusive a face (SOUZA, ANDRADE JÚNIOR, *et al.*, 2017). Abaixo, a Tabela 1 demonstra espécies de parasitos relacionadas com suas formas clínicas e distribuição geográfica.

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* relacionadas com suas formas clínicas e distribuição geográfica. Fonte adaptada: (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2014).

LEISHMANIA	DOENÇA	PRINCIPAIS DISTRIBUIÇÕES GEOGRÁFICAS
<i>L. donovani</i>	Leishmaniose visceral Leishmaniose mucocutânea Leishmaniose cutânea Leishmaniose dérmica	África, Ásia
<i>L. infantum (L. chagasi)</i>	Leishmaniose visceral	África, Europa, área do Mediterrâneo, Sudoeste Asiático, América Central e América do Sul
<i>L. tropica</i>	Leishmaniose cutânea Leishmaniose visceral (rara)	Afeganistão, Índia, Turquia, África, Antiga União Soviética,
<i>L. major</i>	Leishmaniose cutânea	Oriente Médio, Afeganistão, África, Antiga União Soviética
<i>L. aethiopica</i>	Leishmaniose cutânea Leishmaniose mucocutânea Leishmaniose cutânea difusa	Etiópia, Quênia, Iêmen, Antiga União Soviética
<i>L. mexicana</i>	Leishmaniose cutânea Leishmaniose cutânea difusa	Texas, Belize, Guatemala, México
<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea Leishmaniose mucocutânea	América Central e América do Sul
<i>L. peruviana</i>	Leishmaniose cutânea	Panamá, Colômbia, Costa Rica
<i>L. garnhami</i>	Leishmaniose cutânea	Venezuela
<i>L. colombiensis</i>	Leishmaniose cutânea	Colômbia, Panamá
<i>L. venezuelensis</i>	Leishmaniose cutânea	Venezuela
<i>L. lainsoni</i>	Leishmaniose cutânea	Brasil
<i>L. amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea Leishmaniose cutânea difusa	Brasil, Venezuela
<i>L. naiffi</i>	Leishmaniose cutânea	Brasil, Ilhas Caribenhas
<i>L. pifanoi</i>	Leishmaniose cutânea Leishmaniose cutânea difusa	Venezuela
<i>L. lindenberg</i>	Leishmaniose cutânea	Regiões do estado do Pará
<i>L. guyanensis</i>	Leishmaniose cutânea Leishmaniose mucocutânea	Brasil, Guianas, Peru, Equador e Venezuela
<i>L. shawi</i>	Leishmaniose cutânea	Brasil (Regiões Norte e Nordeste)

Os vetores da leishmaniose são dípteros da família Psychodidae, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. Somente as fêmeas são hematófagas. Os mamíferos portadores da leishmaniose, considerados reservatórios, são geralmente animais

silvestres como a preguiça, o tamanduá, gambás, roedores e outros, sendo que grande parte das lesões, nestes animais, é inaparente (RESADORE, PEREIRA JÚNIOR, *et al.*, 2017).

O ciclo de vida da *Leishmania* apresenta, de modo geral, dois estágios morfológicamente distintos. Ela existe na forma flagelada, conhecida como promastigota e presente no tubo intestinal do hospedeiro invertebrado. Essa, por sua vez, é introduzida nos mamíferos através da picada, transforma-se na forma amastigota (dentro dos macrófagos). Enquanto a forma promastigota é flagelada e extracelular, a forma amastigota é intracelular e sem movimento. Dessa forma, a infecção é transmitida, genericamente, através do ciclo homem-vetor-homem, entretanto há relatos de transmissões também por contato direto. Abaixo a figura 1 representa o ciclo biológico homem-vetor-hospedeiro vertebrado para *Leishmania* e demonstra os diferentes estágios do parasita (SHARMA, SHAIKH, *et al.*, 2017).

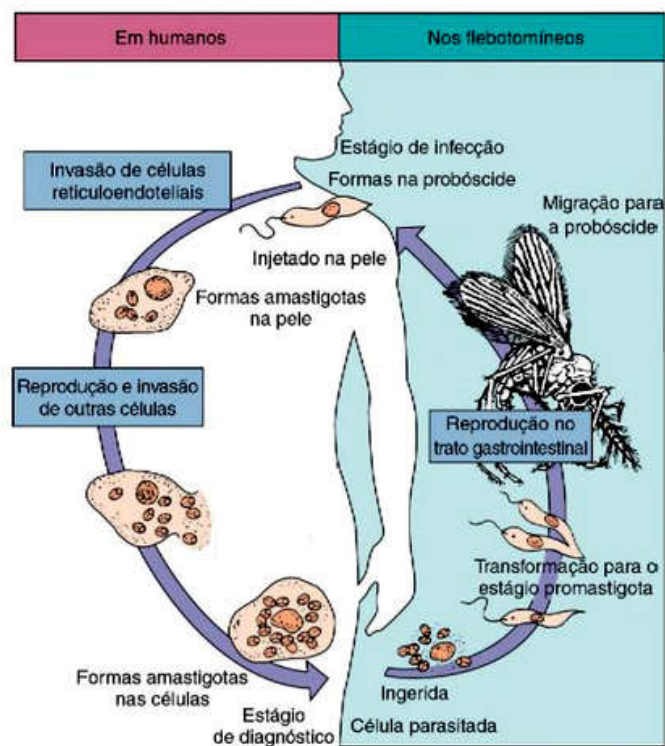


Figura 1. Ciclo biológico homem-vetor-hospedeiro vertebrado para o gênero *Leishmania*. Fonte: (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2014).

No hospedeiro vertebrado, os promastigotas fagocitados pelos macrófagos são induzidos a se transformarem em amastigotas arredondados, devido à própria acidez dentro do fagolisossoma. A forma amastigota, intracelular obrigatória e sem flagelo livre, conta com uma única mitocôndria especializada contendo DNA, denominado cinetoplasto. Por

consequente, os amastigotas proliferam-se dentro dos macrófagos, destruindo-os e liberando uma geração de amastigotas que pode infectar macrófagos adicionais (RESADORE, PEREIRA JÚNIOR, *et al.*, 2017).

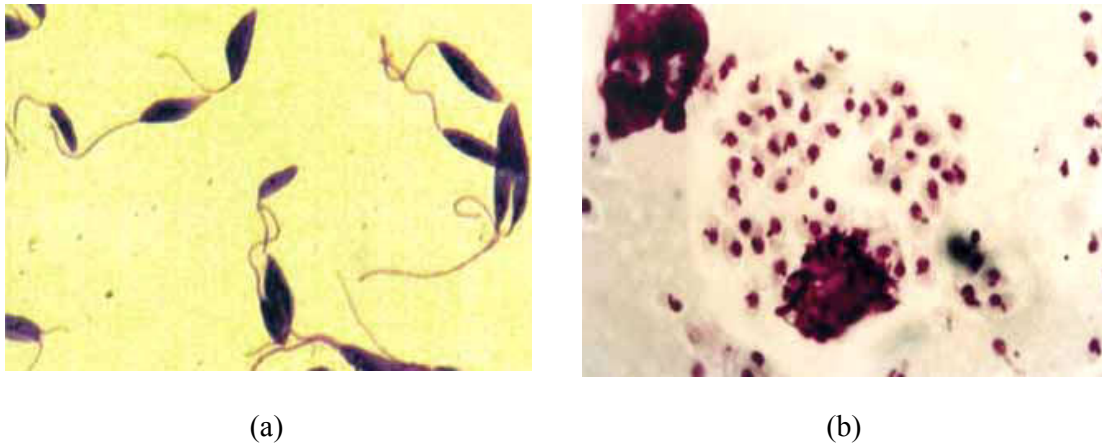


Figura 2. Diferentes formas do gênero *Leishmania* no Ciclo biológico: (a) Forma flagelada ou promastigota; (b) Forma aflagelada ou amastigota. Fonte: (OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE).

2.1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

No Brasil, são reconhecidas sete espécies de *Leishmania* tegumentar responsáveis pela doença no homem, pertencentes ao subgênero *Viannia* e *Leishmania*, em que os agentes etiológicos correspondentes são: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L.(V.) lindenbergi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *Leishmania (L.) amazonensis* (RATH, TRIVELIN, *et al.*, 2003; ABBAS, VINAY e NELSON, 2016). Na figura 3 é possível visualizar tais espécies dentro do quadro taxonômico do parasita *Leishmania*.

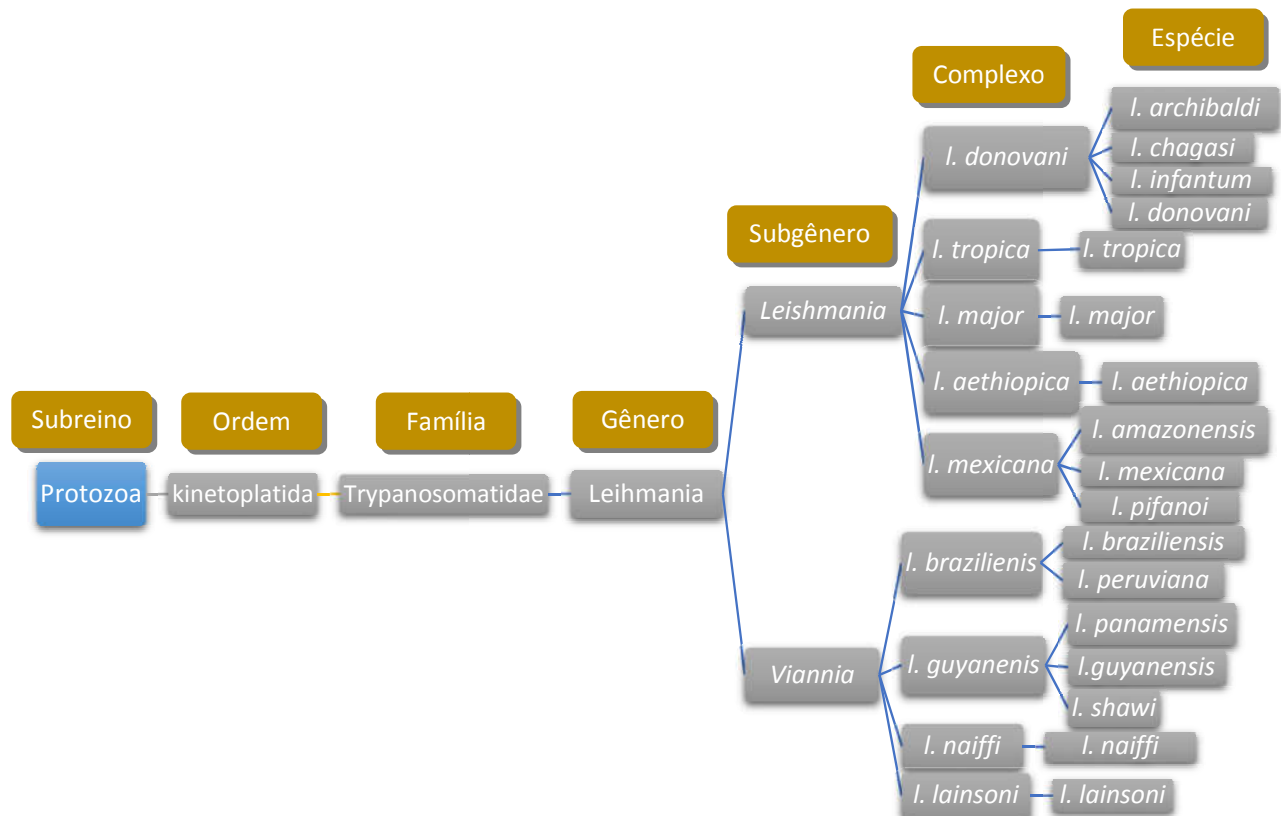


Figura 3. Taxonomia do gênero *Leishmania*. Fonte: (RODRIGUES, 2013).

O estado do Amazonas, no território brasileiro, caracteriza-se como uma região endêmica para diversas patologias tropicais, incluindo também a leishmaniose tegumentar americana (LTA), a qual apresentou uma incidência média de 64,5 casos por 100.000 habitantes no ano 2011. No Amazonas, são reconhecidas, com números substanciais de casos, quatro espécies relacionadas à infecção da LTA: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) guyanensis*, sendo a última espécie a mais prevalente, já que estima-se que mais de 80% dos casos de LTA estejam relacionadas à sua infecção (FIGUEIRA, SOARES, *et al.*, 2014).

O estudo de ALVAR *et al.* (2012) contempla alguns dos dados mais atuais sobre a incidência de leishmaniose tegumentar nos vários continentes mundiais e baseia sua metodologia na revisão sistemática da literatura, em que utilizando os termos leishmaniose e subnotificação em plataformas de busca de periódicos, conseguiu prever estimativas de incidência e obter dados da própria incidência. Em suma, os artigos foram utilizados para

estabelecer graus prováveis de subnotificação para os países em que as suas análises foram realizadas, além de servirem como base para definição de estimativas em países julgados semelhantes no seu grau de subnotificação. Desse modo, foi possível obter uma tabela sobre a incidência e incidência estimada de casos de LTA, a qual está representada na tabela 2, com evidência no território brasileiro, o qual demonstrou pouco mais de vinte seis mil casos de Leishmaniose Tegumentar por ano e uma incidência estimada máxima de mais de cem mil casos por ano (ALVAR, VÉLEZ, *et al.*, 2012).

Tabela 2. Incidência estimada de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (Adaptação ALVAR, VÉLEZ, et al., 2012).

País	Casos registrados/ano	Intervalo de Registro	Incidência anual estimada
Argentina	261	2004-2008	730 à 1200
Bolívia	2647	2004-2008	7400 à 12200
Brasil	26008	2003-2007	72800 à 119600
Colômbia	17420	2005-2009	48800 à 80100
Costa Rica	1249	2002-2006	3500 à 5700
Equador	1724	2004-2008	4800 à 7900
Guiana Francesa	233	2004-2008	650 à 1100
Guatemala	684	2004-2008	1900 à 3100
Guiana	16	2006-2008	50 à 70
Honduras	1159	2006-2008	3200 à 5300
México	811	2004-2008	2300 à 3700
Nicaragua	3222	2003-2007	9000 à 14800
Panamá	2188	2005-2009	6100 à 10100
Paraguai	431	2004-2008	1200 à 2000
Peru	6405	2004-2008	17900 à 29500
Suriname	3	2005-2007	8 à 14
Venezuela	2480	2004-2008	6900 à 11400
Total	66941		187200 à 307800

A Leishmaniose Tegumentar forma um conjunto de afecções com caráter tipicamente espectral. No pólo anérgico são encontradas lesões disseminadas, ricas em parasitas, observando-se uma forte depressão da resposta imune celular. O tratamento nestes casos é pouco eficaz. No pólo hiperérgico, a resposta imune é exacerbada, observa-se rápida cicatrização do centro das lesões, com atividade apenas nas bordas, mas com a presença de poucos parasitas. Há casos frequentes de recidiva, quando então se torna difícil o tratamento (BASTOS, BOECHAT, *et al.*, 2012).

O diagnóstico meramente clínico da leishmaniose tegumentar é de difícil definição, devido à multiplicidade das apresentações clínicas. A evolução clínica pode ser muito variável, sendo descritos períodos entre 18 dias a 4 meses para o aparecimento de lesões. Estas, por sua vez, podem variar desde uma pequena lesão papulosa (que pode progredir para uma úlcera) até lesões extensas e desfigurantes (NUNES, YOSHIZAWA, *et al.*, 2011).

De modo geral, o primeiro sinal da forma cutânea é a formação de uma pápula vermelha que surge no sítio da picada do flebótomo entre 2 semanas e 2 meses após a exposição inicial. A lesão se torna gradativamente irritada, intensamente pruriginosa e pode evoluir para uma lesão ulcerada. A úlcera se torna dura; encrostada e exsuda, com aspecto

úmido, fino e seroso. Neste estágio, uma infecção bacteriana secundária pode ocorrer e acelerar a evolução da ulceração e necrose tecidual. A leishmaniose Cutânea normalmente é causada pela *L. major*, *L. mexicana*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, sendo considerada uma doença relativamente branda e de ulcerações localizadas, consistindo, em muitos casos, em uma única úlcera na pele exposta. A lesão pode se curar sem tratamento em uma questão de meses (variando em torno de 28 semanas), mas geralmente deixa uma cicatriz hipertrófica ou desfigurante (TUON, GOMES, *et al.*, 2008).

Outra espécie associada à leishmaniose cutânea, *L. tropica*, também pode existir sob a forma viscerotrópica. Um tipo de leishmaniose cutânea nodular disseminada também é descrito e foi registrado na Etiópia, causada, provavelmente, por uma alergia aos antígenos de *L. aethiopica* (ABBAS, VINAY e NELSON, 2016).

A leishmaniose mucocutânea é produzida pela *L. braziliensis*, na maioria das vezes, e é encontrada com predominância no Novo Mundo. No caso de *L. braziliensis*, o período de incubação e o aparecimento de úlceras cutâneas primárias são semelhantes aos das outras formas de leishmaniose cutânea; contudo a diferença essencial está na forma clínica, já que se encontram presentes o envolvimento e a destruição de membranas mucosas e de estruturas teciduais subjacentes. Em geral, lesões ulcerativas e não ulcerativas, úmidas, que podem ser desfigurantes, desenvolvem-se na laringe e nas junções mucocutâneas do septo nasal, mucosa oral, ânus ou vulva. No exame microscópico, há um infiltrado inflamatório misto com histiócitos contendo parasitas em associação a linfócitos e células plasmáticas. Posteriormente, a reação tecidual torna-se granulomatosa e há um declínio no número de parasitas. Normalmente, tais lesões mucosas não cicatrizam espontaneamente, sendo comum ocorrerem infecções bacterianas secundárias o que pode desenvolver mutilações faciais e, em casos mais graves, ocasionalmente o óbito. Eventualmente, em casos mais leves e/ou tratados, as lesões tendem a reduzir e cicatrizar, ainda que a reativação possa ocorrer após longos intervalos por mecanismos que não são completamente compreendidos (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2014).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma infrequente de infecção dérmica, sendo encontrada na Etiópia e África Oriental e nas Américas Central e do Sul. A LCD começa, em geral, como um único nódulo cutâneo, que se propaga até que todo o corpo esteja coberto por lesões nodulares. Essas lesões, que se assemelham a quelóides ou enormes verrugas, podem ser confundidas, frequentemente, com os nódulos da *lepra lepromatosa*; entretanto exames laboratoriais as distinguem. As lesões tendem a não se ulcerarem, mas

contém amplos agregados de macrófagos que contém um grande número de leishmânias. Os pacientes, em geral, não apresentam eficiência na resposta imune e tendem a não apresentarem bom prognóstico ao tratamento conservador (ABBAS, VINAY e NELSON, 2016).

Em áreas endêmicas o diagnóstico da LT pode ser realizado com base no exame clínico do paciente, entretanto, o diagnóstico definitivo depende da detecção tanto de amastigotas em amostras clínicas, como de promastigotas em cultura. A demonstração de amastigotas em lâminas adequadamente coradas, obtidas a partir de esfregaços por aposição ou amostras de biópsias de úlceras e culturas de tecido ulcerado, pode determinar o diagnóstico das leishmanioses cutânea e mucocutânea (CASTRO, COSSIO, *et al.*, 2017). A figura 4 contempla imagens de diferentes tipos clínicos de LT, as quais demonstram as variações de lesões e suas especificidades.

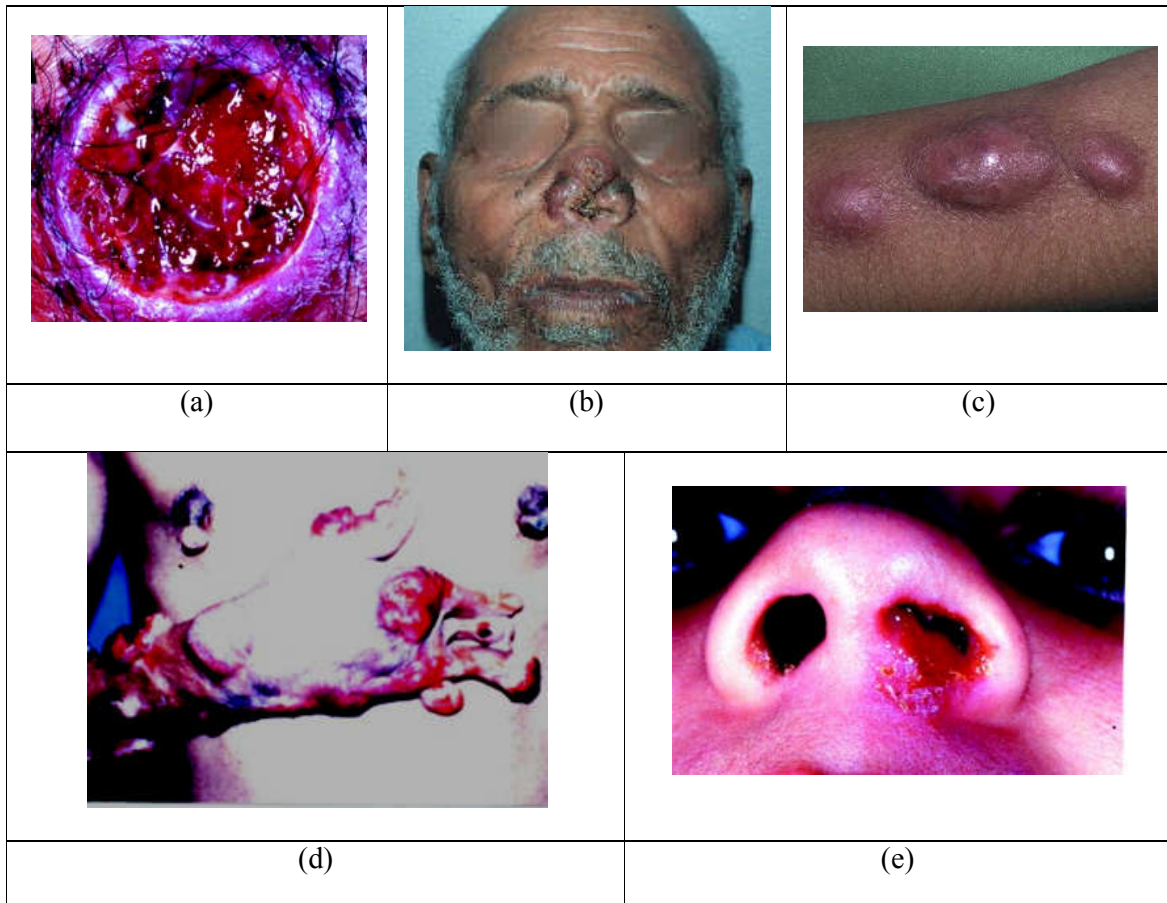


Figura 4. Imagens de diferentes lesões envolvendo leishmaniose cutânea e mucocutânea. (a): Leishmaniose Cutânea: Apresentando lesão clássica em moldura; (b): Leishmaniose Mucocutânea: Apresentando destruição do septo nasal; (c): Leishmaniose Cutânea: Apresentando lesões papulosas; (d): Leishmaniose Difusa e (e): Leishmaniose Mucocutânea: Apresentando lesão úmida em região nasal. Figura adaptada das Fontes: (LUPI, BARTLETT, *et al.*, 2009; GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Quanto ao critério de identificação de espécies, no escopo das formas dérmicas de leishmaniose, as técnicas moleculares para detecção de DNA ou ácido ribonucleico (RNA) são as mais utilizadas não somente para a identificação da espécie, como também para o diagnóstico específico e prognóstico da doença; sendo mais sensíveis que a microscopia ou a cultura, principalmente para a detecção da leishmaniose na forma mucocutânea (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2014).

Em resumo, o diagnóstico da doença é baseado no exame clínico dos sinais, sintomas e históricos fornecidos pelo paciente. Já o diagnóstico laboratorial pode ser realizado por ensaios sorológicos, entre os quais se destacam o ensaio enzimático (ELISA); de imunofluorescência indireta (IFI) e o exame parasitológico (padrão ouro), realizado em material colhido de lesões ou por punção na medula óssea, baço ou fígado, onde a amostra é

examinada em lâminas coradas, inoculada em meio de cultivo ou em hamster. Análises do hemograma, dosagem de proteínas, PCR e IDRM (intradermoreação de Montenegro) também podem servir como indicadores para fomentar o diagnóstico da doença. Ainda, de acordo com a forma clínica, podem ocorrer alterações nos exames hemogramas tradicionais como: diminuição do número total de hemácias, leucopenia com linfocitose relativa e plaquetopenia, bem como inversão da relação albumina/globulina (DUTTA, RAY, *et al.*, 2005).

Atualmente, os fármacos de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose são os compostos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como o estibogluconato de sódio. O relato de uso dos antimoniais data de 1912, quando foram utilizados para o tratamento da leishmaniose pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em na sua forma trivalente (antimônio trivalente – Sb^{3+}), também chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio). O resultado preliminar do antimônio trivalente demonstrou sucesso em muitos dos casos, sobretudo devido à alta taxa de mortalidade ligada à doença (90 % dos casos). No entanto, esta formulação apresentava difícil administração e alta toxicidade, ocasionando alterações cardiopulmonares, angina e depressão. Em 1937, Smith introduziu a utilização do estibogluconato de sódio (Pentostan[®]), um medicamento derivado do ácido estibônico, em que o antimônio está na forma pentavalente e apresentou menores efeitos colaterais e toxicidade em relação ao tártaro emético. O ácido estibônico complexado a carboidratos (duas moléculas de ácido glicônico) é usado para o tratamento das leishmanioses em países de língua inglesa. Em países de língua francesa, espanhola e no Brasil, o fármaco utilizado é o antimoniató de meglumina, também um antimonial pentavalente (Glucantime[®]) (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004).

Nos últimos anos, a prescrição desses agentes pentavalentes tem diminuído devido à apresentação de resistência ao fármaco por muitos pacientes. Além disso, esse tratamento pode ser complicado por uma variação da suscetibilidade das espécies de *Leishmania* aos fármacos, pela variação farmacocinética e pela variação na interação entre o fármaco e o sistema imunológico do hospedeiro. A toxicidade dos antimoniais também é considerável, e como resultado, várias abordagens alternativas para o tratamento da leishmaniose têm sido desenvolvidas (LUPI, BARTLETT, *et al.*, 2009).

De forma notável, pacientes tratados com estibogluconato e clinicamente curados da infecção por *L. braziliensis*, que se destaca por sua cronicidade, latência e metástase com envolvimento de membranas mucosas, apresentaram resultado positivo de PCR até 11 anos após a terapia. Esse efeito indica que se faz necessário a realização de acompanhamento com

esfregaços, culturas e/ou PCR periódicos para garantir que o tratamento tenha sido eficiente e concluso (BERGER, COSSIO, *et al.*, 2017).

A anfotericina é um antibiótico antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo indicada para o tratamento da leishmaniose mucocutânea como fármaco de segunda escolha ou como primeira escolha em pacientes com restrições clínicas como: idade inferior a seis meses ou superior a 65 anos; desnutrição grave e co-morbidades, incluindo infecções bacterianas ou icterícia. A anfotericina pode também ser incorporada em lipossomas carregadores, sendo absorvida pelo sistema retículo-endotelial onde a *Leishmania* reside (RATH, TRIVELIN, *et al.*, 2003). O mecanismo de ação proposto considera que como a membrana dos parasitos contém ergosterol como principal constituinte de sua membrana plasmática (ao invés de colesterol das membranas das células animais); nesse caso, a anfotericina B se ligaria ao ergosterol, com consequente formação de poros, o que levaria a alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita, resultando na morte do mesmo. Em menor escala, a Anfotericina B liga-se também ao colesterol da membrana das células humanas, alterando-as e provocando efeitos adversos (CRISTÁLIA - PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA, 2008). A anfotericina deve ser administrada preferencialmente em ambiente hospitalar, com dose inicial preconizada de 0,3 a 0,5 mg/kg/dia até um máximo de 1 mg/kg/dia. Apresenta ainda diversos efeitos colaterais, tais como: febre, calafrios, cefaléia, flebite, anorexia, náuseas e vômitos, hipocalemia, arritmias cardíacas e, mais raramente, anafilaxia, leucopenia e trombocitopenia (VALE e FURTADO, 2005; CASTRO, COSSIO, *et al.*, 2017).

De maneira geral, a indicação da droga a ser administrada varia de acordo com a forma clínica da doença e com a espécie do parasita infectante. Atualmente os fármacos preconizados pelo Ministério da Saúde para o tratamento de LT são: antimoniato de meglumina, isetionato de pentamidina e anfotericina B (desoxicolato e lipossomal) (BASANO e CAMARGO, 2004; CASTRO, COSSIO, *et al.*, 2017). A Figura 5 demonstra, a título ilustrativo, a representação esquemática de estruturas químicas dos principais fármacos empregados na prática clínica para o tratamento da leishmaniose.

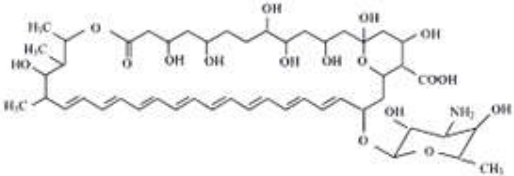
Fórmula estrutural	Nome químico/ Nome comercial
$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{HCO} - \text{Sb} - \text{OH} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{COOH} \end{array} \right] \text{K}$	Tartarato de antimônio e potássio Tártaro emético
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^-$	Antimoniato de N-metilglucamina Glucantime®; Antimoniato de meglumina
$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{HCO} - \text{OH} \\ \\ \text{HCO} - \text{O}^- \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \text{Sb} - \text{O}^- - \text{Sb} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \right] \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de sódio Pentostam® Solustibosan®
$\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$	Isetionato de pentamidina Lomidina
	Anfotericina B Fungizone

Figura 5. Estrutura química dos principais fármacos empregados na prática clínica para o tratamento da leishmaniose. Figura Adaptada de: (RATH, TRIVELIN, *et al.*, 2003).

Conforme mencionado anteriormente por SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004: no Brasil, o medicamento, à base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose é o antimoniato de N-metilglucamina ou antimoniato de meglumina

(Glucantime[®]). Entretanto, apesar do uso em larga escala desse medicamento e sua ampla utilização histórica, pouco se compreende ainda sobre o mecanismo de ação desta droga e sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração. Isto interfere no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, o que leva a uma depleção dos níveis de ATP intracelular e conseqüente morte da *Leishmania*. Além disso, hipotetiza-se que, na forma amastigota, uma metaloprotease zinco dependente poderia ser inativada através da ação do antimônio, quando o mesmo substituísse o zinco nesta enzima, interferindo no desenvolvimento e sobrevivência do parasita (RATH, TRIVELIN, *et al.*, 2003).

Quanto a posologia do antimonial, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que as doses de antimoniais não devem exceder 20 mgSb⁺⁵/kg/dia, não se ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade, que comumente estão associadas à efeitos colaterais como: mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas, renais, pancreáticas e distúrbios cardiológicos. (ALVAR, VÉLEZ, *et al.*, 2012; CURTI, SILVEIRA, *et al.*, 2009). Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de N-metilglucamina é rapidamente absorvido e praticamente 90 % do antimônio é excretado nas primeiras 48 h pelos rins. Em conseqüência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Antimoniais pentavalentes são geralmente menos tóxicos em células de mamíferos, quando comparados aos antimoniais trivalentes (tártaro emético). (BRISTOW, HUDSON, *et al.*, 2006). Porém, em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento também afeta as células normais e imunológicas do paciente, o que pode levá-lo ao óbito. Tal medicamento, para ter eficácia contra a leishmaniose, é aplicado em doses tão elevadas que promove uma impregnação farmacológica do paciente, podendo inclusive ser detectado no cabelo do mesmo após um ano do término do tratamento (RATH, TRIVELIN, *et al.*, 2003; DUTTA, RAY, *et al.*, 2005).

A pentamidina faz parte do grupo das diamidas e representa também uma das alternativas para o tratamento da leishmaniose tegumentar, apresentando resultados satisfatórios principalmente para o a *L. guyanensis*, com dose total máxima de 720 mg. A pentamidina, além de ser relativamente eficaz na terapia da leishmaniose, apresenta eficácia comprovada também no tratamento de casos incipientes de tripanossomíase gambiense ou rodesiense. A dose preconizada varia de 2 a 4 mg/kg/dia, via intramuscular, preferencialmente em dias alternados, por 5 a 25 semanas. Assim como as demais drogas

indicadas ao tratamento da LT deve-se haver sempre o monitoramento clínico, eletrocardiográfico e laboratorial prévio ao início da medicação. Os efeitos colaterais são similares aos observados pelo antimoníato de meglumina, em que se encontram frequentes: dores, abscessos estéreis, náuseas, vômitos, tontura, mialgias, hipo e/ou hiperglicemia (PELISSARI, CECHINEL, *et al.*, 2011).

Vale salientar que todos os fármacos convencionais para o tratamento da LT podem apresentar grande potencial de resistência do parasita, tendo em vista a heterogeneidade de espécies envolvidas e suas respectivas rotas metabólicas. Além disso, a indução de efeitos colaterais limita a utilização e continuidade do tratamento, condições necessárias para a terapêutica da patologia, o que afeta a eficácia da medicação e aumenta o risco de resistência. Outro ponto negativo relacionado à terapêutica convencional está no fato de que esses fármacos são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente e, infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fato que favorece o aparecimento de cepas resistentes e dificultam a cura (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004).

Dessa forma, devido aos problemas enfrentados com a terapia disponível, novos medicamentos e regimes de tratamento estão sendo estudados e pesquisadores somam esforços para torná-los acessíveis à sociedade. Dentre os tratamentos que estão sendo estudados e já apresentam resultados preliminares positivos para uma gama de patologias tropicais e até mesmo oncológicas, destacam-se as terapias baseadas na *nanobiotecnologia* e suas mais variadas especificidades (LUPI, BARTLETT, *et al.*, 2009; JENNINGS, SOUZA, *et al.*, 2014).

2.1.2. Recursos Físicos como Tratamento Alternativo para Leishmaniose Tegumentar

Nas últimas décadas muitos estudiosos têm dedicado esforços para obtenção de métodos e técnicas menos tóxicas e com menor apresentação de efeitos colaterais para o tratamento de lesões de leishmaniose cutânea (LC). Dentro das opções com características físicas preponderantes encontram-se aplicação de crioterapia (utilizando nitrogênio ou CO₂); terapia fotodinâmica (especialmente com utilização protoporfirinas); fotoablação (com laser de CO₂) e Termoterapia (MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; RANAWAKA, WEERAKOON e OPHATELLA, 2011; BAPTISTA e WAINWRIGHT, 2011).

O mecanismo de ação da termoterapia, na leishmaniose, baseia-se na capacidade de destruição do parasita através da aplicação do calor, que é obtida, de acordo com a literatura, pela aplicação da radiofrequência: termoterapia por radiofrequência (RFHT) (BUMB e

SATOSKAR, 2011; BUMB, PRASAD, *et al.*, 2013; LOBO, SOARES, *et al.*, 2006; ARONSON, WORTMANN e BYRNE, 2010; MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Em geral, a dinâmica da RFHT caracteriza-se por uma única aplicação, de emissão controlada e localizada, de radiofrequências incidente nas lesões de LC durante 30 à 60 segundos por cm². O processo de aplicação normalmente é realizado sob anestesia local (lidocaína a 1 %, por exemplo) com utilização de um gerador de campo de radiofrequência já patenteado e conhecido como: ThermoMed 1,8; Thermosurgery Inc., Phoenix, AZ, EUA (BUMB, PRASAD, *et al.*, 2013).

Esta terapia tem demonstrado alta eficácia para tratamento de LC, mesmo em comparação com antimoniais, quando em estudos transversais ou de curto prazo (SADEGHIAN, NILFROUSHZADEH e IRAJI, 2007; REITHINGER, MOHSEN e WAHID, 2005), bem como em um único estudo a longo prazo envolvendo 27 soldados infectadas com *Leishmania major* dentro Iraque (ARONSON, WORTMANN e BYRNE, 2010). RFHT também apresenta maior viabilidade econômica em comparação com tratamento convencional (antimonial), sobretudo em regiões endêmicas, uma vez que requer apenas um única aplicação e os antimoniais múltiplas aplicações parenterais (MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Uma evidência adicional para corroborar com as vantagens da RFHT é o eventual efeito sistêmico da terapia por hipertermia local em leishmaniose cutânea, a qual tem demonstrado cura de lesões contralaterais às tratadas, sendo descritas por estudo de caso em diversos pacientes, porém com mecanismo de cura e imunológico ainda desconhecidos (LOBO, SOARES, *et al.*, 2006; LOPEZ, ROBAYO, *et al.*, 2012). Contudo, a técnica da RFHT tem certas limitações como o tamanho da lesão a ser tratada, em que observa-se maior efetividade em lesões com tamanho médio em torno de 2 cm², indicando que a RFHT pode não ser adequada para o tratamento de lesões com grandes dimensões. Tal limitação, entretanto, não está diretamente associada à hipertermia propriamente dita e sim ao modo de geração da mesma (via radiofrequência), a qual possui limitações físicas para penetração tissular (BUMB, PRASAD, *et al.*, 2013). Tal afirmação pode ser corroborada por estudos que aplicam hipertermia com auxílio de outros métodos físico-químicos, como é o caso da hipertermia por campo magnético alterando em tratamentos oncológicos (COSTO, BELLO, *et al.*, 2012; LOPEZ, TEIJEIRO e RIVAS, 2013).

2.2. Nanotecnologia

Em termos gerais, considera-se nanotecnologia como o estudo e a tecnologia empregada para obtenção de estruturas em escalas nanométricas, isto é, em sistemas formados por grãos na ordem de nanômetros (10^{-9} m). Tais estruturas possuem propriedades físicas e químicas bastante diferentes das observadas em materiais volumosos e, portanto, recebem especial atenção, sobretudo, nos dias atuais, em que se objetiva de modo incessante a eficiência de processos e produtos nas diversas aplicações (PITAKSUTEEPONG, 2016; HERNANDEZ, NOGALES, *et al.*, 2009).

De acordo com a etimologia da palavra nanotecnologia, é possível obter o seguinte significado:

“Nanotecnologia: Área de estudo que envolve partículas, materiais e sistemas em escala nanométrica. Método que propicia a subdivisão ou a geração de corpos e partículas minúsculas. Tecnologia que opera em sistema nanométrico, com extensões ou tamanhos equiparados aos átomos e moléculas (Etimologia: nano + tecnologia)” (FERREIRA, 2010).

A nanotecnologia também pode ser definida como todo o conhecimento técnico e científico aplicado em escala nanométrica, sendo a unidade de medida o nanômetro (nm), que corresponde à bilionésima parte de um metro, ou a um milionésimo de milímetro; assim as partículas produzidas em escala “nano” possuem dimensões menores ou igual a 100 nm (PITAKSUTEEPONG, 2016). A Figura 6 ilustra uma escala de comprimento, em nanômetros, que varia de 10^{-1} a 10^9 e demonstra a variação de tamanho desde uma bola de tênis até uma molécula de água, evidenciando também, em termos gerais, o tamanho de seres como: protozoários do gênero *Leishmania*, bactérias e vírus.

De modo genérico, a forma promastigota do protozoário *Leishmania* é alongada, com aspecto fusiforme ou piriforme, com um flagelo livre na região anterior, e seu tamanho varia entre 16 à 40 por 1,5 à 3 micrômetros. A forma amastigota, a qual é intracelular, no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, possui formato esférico a ovóide e o tamanho varia de acordo com a espécie, ficando entre 1,5 à 3 por 3 à 5,5 micrômetros. Já o macrófago que é uma célula esférica e relativamente grande, a qual apresenta as formas amastigotas em seu vacúolo parasitário, corresponde a aproximadamente 25 μ m de diâmetro (NEVES, 2001).

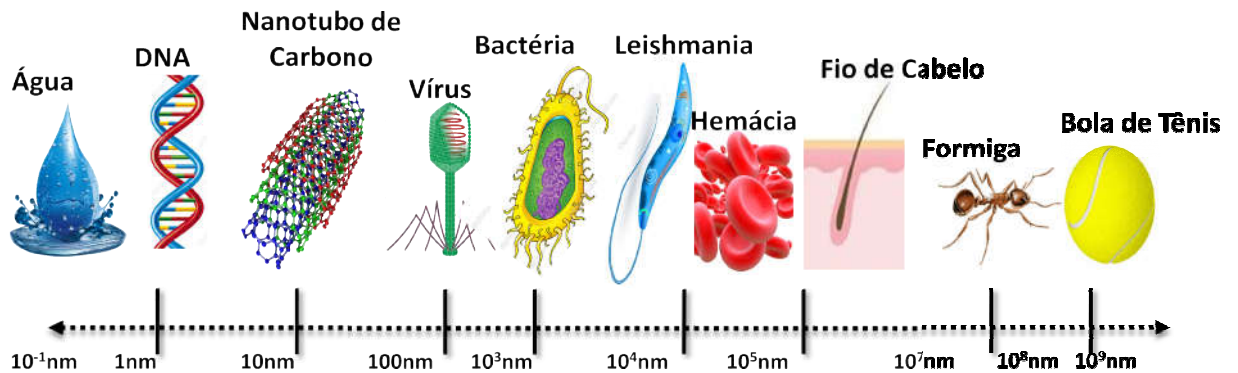


Figura 6. Escalas de comprimento mostrando o contexto nanômetro. A escala de comprimento no topo varia de 10^{-1} a 10^9 nm e ilustra o tamanho da bola de tênis comparada a molécula de água. Figura adaptada de: (THE ROYAL SOCIETY ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

Um dos primeiros relatos sobre a potencialidade da nanotecnologia data de dezembro de 1959, em que o físico americano e vencedor do Prêmio Nobel, Richard P. Feynman, apresentou a palestra intitulada “*There’s plenty of room at the bottom*”, que traduzindo significa: “Existe mais Espaço no Interior”. Nela, ele defendeu uma visão tecnológica futurista de miniaturização extrema, citando os benefícios de possíveis grandes descobertas que poderiam surgir da fabricação e manipulação de materiais em escalas moleculares e atômicas, isto é, diminutas e entendidas hoje como nanométricas (KNOBEL, NUNES, *et al.*, 2008; CANCINO, MARANGONI e ZUCOLOTTI, 2014).

No início do século XXI, a idealização de Feynman tornou-se real, através do avanço no controle da fabricação dos mais diversos materiais, sendo possível observar novas propriedades físicas e químicas em nanoescala, as quais oferecem oportunidades jamais vislumbradas para sistemas e processos observados em materiais volumosos ou massivos (comumente referido pelo termo em inglês “*bulk*”) (MENDES, 2013).

Nesse sentido, em 1974, Norio Taniguchi cunhou pela primeira vez, o termo nanotecnologia, descrevendo-o como uma “ciência que consiste principalmente no processamento da separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula” (FIGUEIRAS, 2014). Kim Eric Drexler aprofundou os conceitos sobre nanotecnologia, sendo estes mais próximos do que é utilizado atualmente, referindo-se a nanotecnologia como uma metodologia de processamento envolvendo a manipulação átomo a átomo (CASANOVA, 2010).

A partir de 1980 o Programa Norte-Americano para Nanotecnologia (*National Nanotechnology Initiative - NNI*) passou a subsidiar a nanotecnologia nos Estados Unidos e considerou que, do ponto de vista científico, um sistema em escala manométrica possui dimensões comparáveis a parâmetros físicos importantes como, por exemplo, o comprimento de onda *De Broglie*. Nesse regime, os efeitos quânticos se tornam muito mais pronunciados alterando as propriedades físicas outrora observadas em maiores dimensões (MARSH, 2012).

Assim, as propriedades dos materiais na dimensão “nano” podem ser consideradas bem diferentes, essencialmente, porque apresentam uma área superficial muito grande quando comparadas com uma massa correspondente do mesmo material em dimensão macroscópica, sendo esta área superficial a responsável pela grande reatividade dos átomos na superfície. Além disso, nestas dimensões os efeitos quânticos, relacionados às cargas eletrostáticas, começam a dominar o comportamento do material afetando propriedades ópticas, elétricas e magnéticas (FILIPPONI e SUTHERLAND, 2014).

Em termos gerais, muitas das teorias utilizadas para a explicação de fenômenos observados nos materiais macroscópicos não podem ser aplicados para o entendimento das relações propriedades/estrutura/aplicabilidade na escala nanoscópica (SOUZA, 2011; SCHETTINO JUNIOR, 2009).

Como a maior parte dos processos biológicos ocorre à escala dos nanômetros, a nanotecnologia tem enormes potencialidades de aplicação no estudo. Recentemente, a nanotecnologia tem recebido especial atenção da área biomédica, sendo utilizada em vários setores da medicina. Assim, as nanopartículas estão sendo desenhadas tanto para o diagnóstico e terapia de doenças quanto como ferramentas biomédicas para investigação e marcadores celulares (SCHULZ, 2013). A figura 7 apresenta, em escala cronológica, alguns fatos importantes que revelam a chamada “revolução nanotecnológica” (ESHGHI, SAZGARNIA, *et al.*, 2013; DURAN, MATTOSO e MORAIS, 2012).

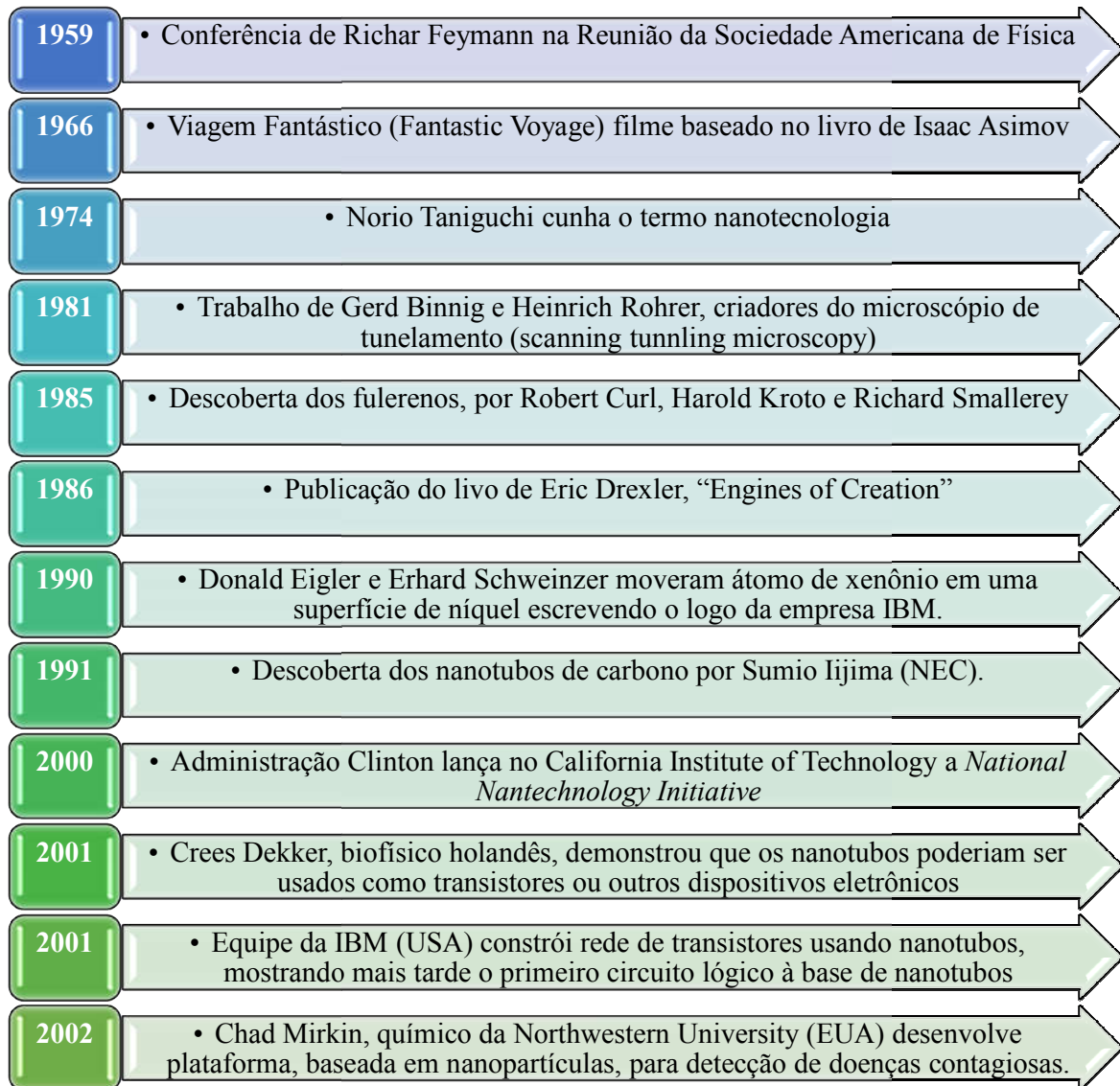


Figura 7. Cronologia de alguns fatos importantes na história da nanotecnologia. Figura adaptada de: (DURAN, MATTOSO e MORAIS, 2012).

2.3. Nanopartículas Magnéticas (NPM's)

O desenvolvimento de novos nanomateriais e os respectivos avanços significativos que foram realizados na síntese de nanopartículas, com a possibilidade de controle geométrico e propriedades físico-químicas ou superficiais modificadas, resultou na melhoria da biocompatibilidade e direcionamento ativo, levando ao desenvolvimento de uma gama diversificada de nanomateriais que podem ser aplicados no tratamento e diagnóstico em diversos tipos de células, hipertermia magnética, liberação controlada de fármacos, bioseparações, agentes de contraste em imagiologia de ressonância magnética, entrega de

fármacos e destruição de tumores via diferentes técnicas terapêuticas (NAZIR, HUSSAIN, *et al.*, 2014).

Por esse ponto, as NP's magnéticas têm despertado grande interesse na área biotecnológica, uma vez que seu tamanho médio pode ser considerado menor ou comparável com modelos biológicos: vírus (20 a 450 nm), proteínas (5 a 50 nm) e genes (10 a 100 nm de comprimento). Em adição, a capacidade de serem manipuladas, por um gradiente de campo magnético externo para transporte e imobilização “*in vivo*” de modo não-invasivo, as tornam candidatas promissoras para muitos estudos (PANKHURST, CONNOLLY, *et al.*, 2003; DI CORATO, ESPINOSA, *et al.*, 2014).

Suas dimensões reduzidas e sua possibilidade de funcionalização por ligantes específicos conferem às NPM's a maior facilidade no trânsito para diversos compartimentos de organismo vivos, além disso, suas características eletromagnéticas, em contraste com a membrana superficial de células oncológicas ou infectadas, lhes permite maior afinidade e acúmulo nesses tecidos celulares, o que pressupõem certa seletividade (DOBSON, 2006; SUN, LEE e ZHANG, 2008). Sendo assim, em diversas aplicações biomédicas, as NPM's podem ser utilizadas, tanto no que tange fins terapêuticos, como para fins diagnósticos – ou simultaneamente com a função “*teranóstica*” – no tratamento contra o câncer, em sistemas de distribuição e carreamento de drogas, em ressonância magnética nuclear, e na hipertermia magnética (BARRY, 2008; LOPEZ, TEIJEIRO e RIVAS, 2013).

O tamanho, a morfologia e a composição das NPM's são também elementos que podem ser ajustados para otimizar a sua resposta biológica, seja pelo controle da cinética de liberação da substância ativa ou pela vetorização da partícula ao local de ação no organismo. Nesse sentido, uma das modificações relevantes na estrutura da partícula envolve alterações químicas na estrutura ou ligante superficial da NPM, o qual pode ser uma matriz polimérica, propiciando o controle da liberação da substância ativa e o reconhecimento molecular das nanopartículas, através de interações com determinados “*sítios alvo*” no organismo (DEATSCH e EVANS, 2014).

Recentemente, gerações avançadas de NPM's em sistemas multicomponentes têm demonstrado capacidades diversificadas para serem exploradas em aplicações múltiplas, se adequando ao desenvolvimento de materiais voltados a área médica. Exemplos incluem sistemas do tipo “*core-shell*”, permitindo a obtenção de sistemas multifuncionais e ampliando suas possibilidades de utilização nas diversas áreas de materiais. Neste caso, as nanopartículas magnéticas podem ser encapsuladas em sílica ou metais nobres, o que permite, inclusive, a

proteção da nanopartícula em si (*core*) contra oxidação, sem que haja a redução significativa de suas propriedades magnéticas (WANG, BILLONE e MULLETT, 2013).

Os carboidratos são moléculas envolvidas no reconhecimento celular, logo, nanopartículas que contem carboidratos em seu revestimento, podem ser usadas para a vetorização ativa de fármacos à células-alvo. Estratégias de vetorização ativa exploram os princípios baseados em receptores, nos quais ligantes de receptores específicos anexados ao complexo carreador-fármaco levam o fármaco a uma célula-alvo, onde este é liberado. Dependendo do caso, o fármaco pode atingir um compartimento específico dentro da célula. Em uma situação ideal, a dose de fármaco pode ser bastante reduzida através dessa estratégia, o que reduziria os efeitos adversos (MAHMOUDI, SERPOOSHAN e LAURENT, 2011).

Nanopartículas magnéticas, contendo glicopolímeros em sua superfície, podem ser considerados interessantes na prática terapêutica ou diagnóstica de organismos vivos, uma vez que glicopolímeros mimetizam os gliconjugados de origem biológica, envolvidos em processos de reconhecimento celular, adesão célula-célula, regulação do crescimento celular e inflamação. Há relatos de vetorização por meio de partículas magnéticas com resíduos de galactose com afinidade por lectinas dos hepatócitos; e lipossomas (contendo resíduos de manose) vetorizados para células como macrófagos e células dendríticas. Outros ligantes de origem orgânica também são relatados na literatura como viáveis para conjugação em NPM's e podem ser usados em sistema de vetorização, sendo elas: N-acetilgalactosamina, para o receptor asialoglicoproteína (no fígado); Manose, Fucose, N-acetilglicosamina, para o receptor de manose presente em macrófagos alveolares, do fígado e do baço; e Sialil-Lewis, para as selectinas P e E, das células endoteliais (LEPENIES, YIN e SEEBERGER, 2010; PITAKSUTTEEPONG, 2016).

Dentro do grupo de NPM's, que podem ser consideradas como umas das mais interessantes no campo das aplicações biomédicas destacam-se as nanopartículas de óxido de ferro (magnetita - Fe_3O_4 e a maghemita - $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), as quais apresentam características imprescindíveis para aplicação em saúde, como: elevada biocompatibilidade, estabilidade química em condições fisiológicas, baixa toxicidade e características de composição e morfologia manipuláveis (durante diversos processos de síntese), que são, em geral, simples e econômicos (PUVVADA, MANDAL, *et al.*, 2012; MIRZA, ALI, *et al.*, 2015).

O termo em inglês para nanopartículas magnéticas é conhecido por SPION's e normalmente está associado à nanopartículas da ordem de 10 nm a 100 nm de diâmetro. Além desses, os óxidos mistos de ferro com íons de metais de transição, tais como: cobre, cobalto,

níquel e manganês, também fazem parte da categoria de SPION's, devido apresentarem propriedades superparamagnéticas. No entanto, nanopartículas de magnetita e maghemita são os SPION's mais amplamente utilizados em diversas aplicações biomédicas, sobretudo em sistema de ressonância magnética (WAHAJUDDIN e ARORA, 2012).

Este superparamagnetismo, única de nanopartículas magnéticas, é muito importante para a sua utilização como veículos de entrega de droga, porque estas nanopartículas podem literalmente arrastar moléculas de fármaco para o seu local alvo no corpo, sob a influência de um campo magnético aplicado. Além disso, uma vez que o campo magnético é removido, as partículas magnéticas tendem a não reterem magnetismo residual à temperatura ambiente e, portanto, não se torna susceptível a aglomeração (isto é, elas são facilmente dispersas), evitando assim, a aceitação pelos fagócitos e aumentando a sua meia-vida na circulação. Além disso, devido a uma tendência insignificante para aglomerar, as nanopartículas magnéticas não representam perigo de trombose ou bloqueio nos capilares sanguíneos (WAHAJUDDIN e ARORA, 2012; MAHMOUDI, SERPOOSHAN e LAURENT, 2011).

Em resumo, as NPM's de óxido de ferro são formadas, habitualmente, por diferentes tipos de ferritas cúbicas que apresentam a expressão geral $M^{2+}Fe_2O_4$, na qual M^{2+} é um metal que pode ser Mg, Co, Zn, Fe (Fe_3O_4 – magnetita), ou então maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) (LYUBUTIN, STARCHIKOV, *et al.*, 2016). Na nanomedicina, estes materiais têm se mostrado altamente eficientes para atuação em: sistemas de *drug-delivery*; como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética e na terapêutica do câncer por hipertermia magnética (MARTINEZ-GONZÁLEZ, ESTELRICH e BUSQUETS, 2016; HAEGELE, VAALMA, *et al.*, 2016). Neste último caso, nanopartículas magnéticas absorvem a energia de um campo magnético oscilante, convertendo-a em calor (CHEHADE, SRIVASTAVA e BULTE, 2016; THORAT, LEMINE, *et al.*, 2016).

Segundo ALVES (2007), sob um campo magnético alternado de alta frequência, os momentos magnéticos tentam se reorientar acompanhando o campo, e a energia representada por essa perda de fase é dissipada para o meio na forma de calor. A reorientação das nanopartículas na direção do campo ocorre através da relaxação de Néel (rotação do momento dentro da partícula) e da relaxação de Brown (rotação da partícula em si) e produz mais calor por unidade de massa do que partículas maiores. Assim, as propriedades físicas dessas partículas podem ser aplicadas para produzir um efeito, como a hipertermia, que auxilie no tratamento de doenças (ALVES, 2007; MAHMOUDI, SANT, *et al.*, 2011).

2.3.1. *Metabolismos das Nanopartículas Magnéticas*

Nanopartículas magnéticas permanecem em circulação no sangue por períodos de tempo que dependem do tamanho da partícula e da superfície de revestimento (ligantes associados). Tal relação é diretamente proporcional, porque a captura das NP's ocorre pelo sistema retículo endotelial - SER (também conhecido como sistema fagocítico mononuclear, consistindo basicamente pela ação dos "macrófagos"). Os macrófagos, por sua vez, são células de grandes dimensões (aproximadamente 25 μm), ricos em lisossomas, que fagocitam, de modo geral, elementos estranhos ao corpo. Tais células são vitais para o processo de resposta imune, eliminação de patógenos e controle da homeostase dos tecidos; além de possuírem um papel importante na reciclagem do ferro presente no corpo, devido à eliminação do excesso de ferro pautada com o alto nível de expressões protéicas relacionadas com a eliminação de ferro total (KUNZMANN, ANDERSSON, *et al.*, 2011).

Quando presentes no organismo; por via injetável, por exemplo; as NP's são rapidamente endocitadas pelos macrófagos circulantes ou residentes e internalizados em seus lisossomas. Mediante o processo de endocitose celular, as NP's normalmente apresentam um decréscimo gradativo de pH, desde o meio extracelular (com pH variando entre 7 e 7,5), passando pelo endossomo intracelular (pH entre 5 e 6), até atingir o microambiente ácido dos lisossomas (com pH entre 4,5 e 4,8). É importante ressaltar que a membrana lisossomal admite que enzimas digestivas trabalhem no pH ácido, bombeando prótons do citosol. Assim, as nanopartículas limitadas internamente nos lisossomos são expostas a efeitos combinados de pH ácido, hidrolases lipossomais e, eventualmente, quelantes de ferro envolvidos na regulação do ferro (LÉVY, LAGARDE, *et al.*, 2010).

De modo geral, o estado de oxidação preferencial do ferro é a forma férrica, devido o oxigênio e o pH fisiológico normal encontrados no plasma (pH inicial e concentração de oxigênio livre quando as nanopartículas entram em contato com o organismo). Dessa forma, os íons ferrosos, presente no plasma, tendem a ser rapidamente oxidados pela presença de oxigênio molecular endógeno, resultando na conversão de íon ferroso em férrico (**ferroso**, em química, indica um composto de ferro bivalente; com número de oxidação +2; já o termo férrico refere-se a um composto de ferro trivalente; com número de oxidação +3) (LÉVY, LAGARDE, *et al.*, 2010).

Apesar do Fe^{3+} ser o estado de oxidação fisiológico preferencial do ferro, ele é altamente reativo e pode induzir atividade catalítica, resultando em severos danos celulares. Como resultado, proteínas e quelantes carreadores de ferro são usados para permitir sua

segura transferência através das células e para garantir o estoque intracelular do excesso de ferro. Nos vertebrados, a transferrina é a responsável pelo transporte seguro do ferro e a ferritina está envolvida no seu estoque. Ambas as proteínas se ligam fortemente ao ferro, limitando sua reatividade e reduzindo a formação de produtos hidrolíticos, que podem causar dano celular. Além disso, a ligação do ferro nessas proteínas é reversível, de modo que ele pode ser obtido quando necessário em processos metabólicos, síntese de enzimas e proteínas e/ou produção de heme (FISHER e CHAN, 2007).

Devido a essa condição biológica peculiar, as NP's de óxido de ferro se apresentam como uma alternativa para aplicações biológicas no diagnóstico ou tratamento com óxidos de ferro, visto que tendem a ser rapidamente fagocitados pelos macrófagos e apresentarem menor toxicidade que nanocristais inorgânicos, possuindo assim, maior probabilidade de serem transformados pela homeostase celular. Além disso, diferentes macrófagos utilizam distintos tipos de reconhecimento celular, por exemplo, em estudo prévio, macrófagos primários humanos não apresentaram nenhum efeito imunomodulatório quando as células foram expostas a nanopartículas de óxido de ferro revestidas com dextran (30 nm), mas os macrófagos peritoneais apresentaram secreção de citocinas anti-inflamatórias e redução na produção de citocinas pró-inflamatórias quando expostos à nanopartículas também revestidas com dextran (20 a 60 nm) (KUNZMANN, ANDERSSON, *et al.*, 2011).

Já experimentos de biodistribuição demonstraram uma acumulação de 55 % da dose de NP's magnéticas, revestidas com ácido oleico/surfactante, (tamanho médio de 190 nm), em fígados de ratos, devido à eliminação das partículas pelo sistema mononuclear fagocitário. Em suma, os estudos prévios apontam para a importância da avaliação e definição adequada para os diferentes sistemas celulares, visando análise toxicológica das NP's, uma vez que a absorção celular pode acontecer por diferentes caminhos, dependendo das propriedades das NP's e do tipo específico de célula alvo (SOUZA, MOHALLEM e SOUZA, 2011).

2.4. Óxido de Ferro

Óxidos de ferro é uma denominação genérica para compostos formados pelo elemento ferro (Fe) combinados com o oxigênio (O). Tais elementos são encontrados em abundância no mundo, possuindo uma distribuição territorial heterogeneia quanto à suas especificidades de fases cristalinas. Sua larga produção em laboratórios, associada com suas excelentes propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de manipulação dessas

propriedades, tornam os óxidos de ferro altamente interessantes em várias aplicações tecnológicas (COSTA, 2013; CALLISTER JR. e RETHWISCH, 2014).

O sistema Fe-O é representado pelo diagrama de equilíbrio de fase binário mostrado na Figura 8. Este diagrama mostra as fases Fe-O, subdividido em ferro alfa, ferro gama, ferro delta, wustita, magnetita e hematita (MIRZA, ALI, *et al.*, 2015; NOLDIN JUNIOR, 2007).

Em linhas gerais, os óxidos de ferro (Wustita-FeO; Magnetita-Fe₃O₄; Hematita- α -Fe₂O₃ e Maghemita- γ -Fe₂O₃) são, via de regra, preparados por misturas estequiométricas de sais ferrosos e férricos em meio aquoso com a adição de uma base, com ou sem atmosfera inerte e à temperatura ambiente ou elevada (LOPEZ, TEIJEIRO e RIVAS, 2013).

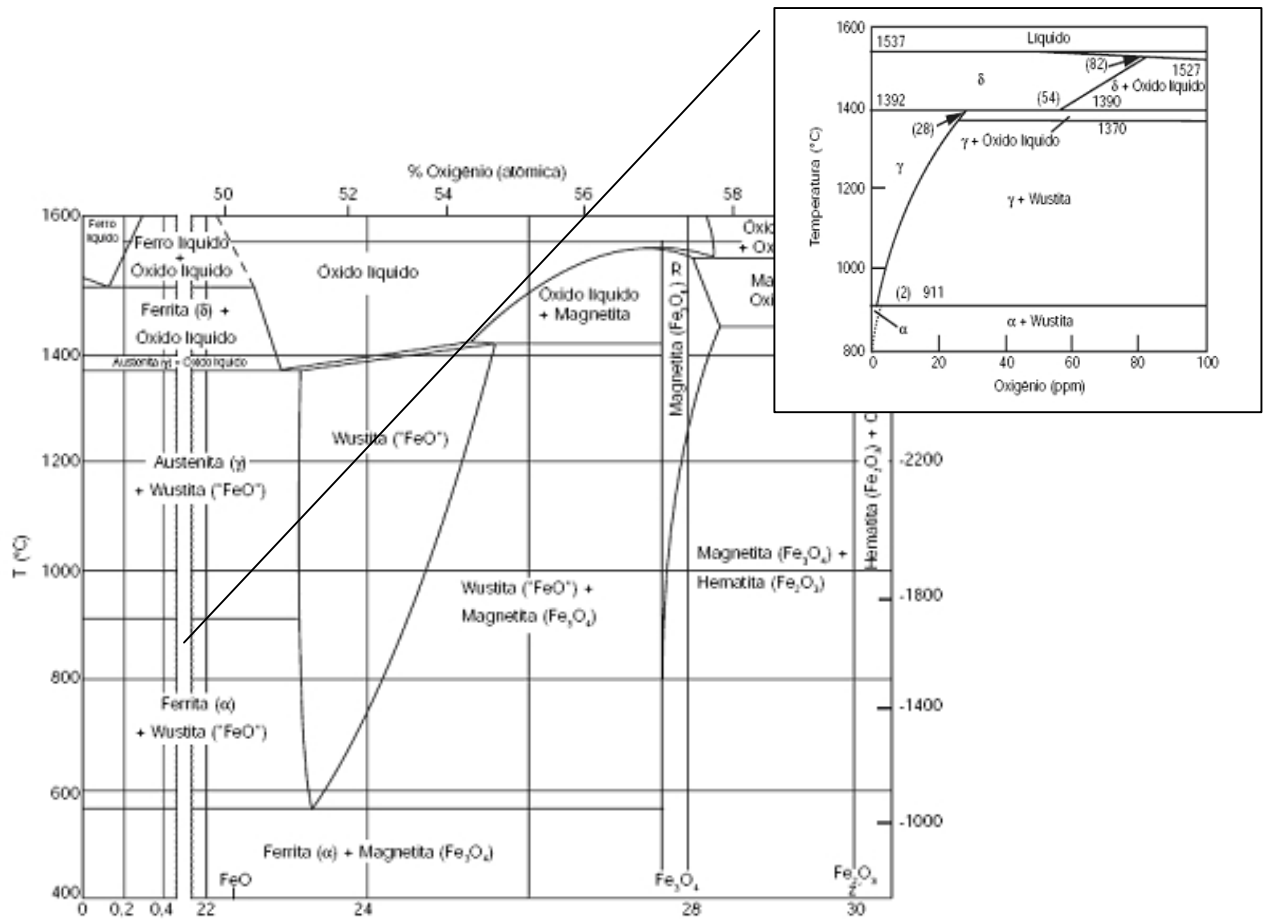


Figura 8. Diagrama de fase binário Fe-O. Figura Adaptada de: (NOLDIN JUNIOR, 2007).

A wustita caracteriza-se como um dos óxidos de ferro com estrutura cristalina CFC (cúbica de face centrada) e o íon de ferro arranjado nos interstícios octaédricos entre os íons de oxigênio. A wustita é instável em temperaturas abaixo de 560°C, quando ela se decompõe em $Fe\alpha + magnetita$ ($4“FeO” \Rightarrow Fe_3O_4 + Fe-\alpha$). Um estágio metaestável pode ser obtido mediante resfriamento, mas existe uma demanda energética para tal, limitando as áreas de aplicação da mesma. A fórmula química da wustita é comumente descrita como “FeO”, indicando um átomo de ferro para um átomo de oxigênio, entretanto, sua real estrutura normalmente se apresenta insuficiente em ferro, desse modo, a correta expressão dar-se pela fórmula Fe_xO , em que “x” representa um fator em torno de 0,95. Na auto-redução, a wustita pode ser obtida através da redução da magnetita, ou pela re-oxidação do ferro metálico. A figura 9 demonstra o campo de predominância da wustita dentro do diagrama de fase de Fe-O (NOLDIN JUNIOR, 2007; CALLISTER JR. e RETHWISCH, 2014).

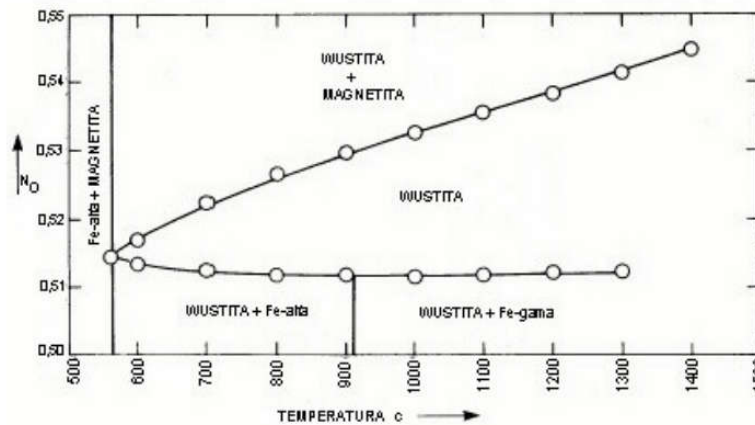


Figura 9. Campo de Predominância da Wustita. Fonte: (NOLDIN JUNIOR, 2007).

A hematita, do grego “haimatites”: como sangue, é um dos óxidos de ferro que apresentam o maior estado de oxidação e sua composição química é expressa por Fe_2O_3 , o qual corresponde à 69,94% de ferro e 30,06% de oxigênio, quando na forma pura. Ela apresenta estrutura hexagonal compacta, é de cor normalmente acinzentada, podendo variar desde uma coloração preta ou marrom até um prata cintilante, e tem peso específico aproximado 5.25 t/m^3 (NOLDIN JUNIOR, 2007).

A Hematita é um dos mais importantes tipos de minério de ferro, particularmente o mais importante no Brasil, do ponto de vista metalúrgico, devido a sua ampla distribuição territorial, grau de oxidação e multiplicidade de origens em rochas (CALLISTER JR. e RETHWISCH, 2014).

Além da origem “natural” da hematita, ela também pode ser obtida por meio da oxidação da magnetita, em que dois diferentes tipos de óxidos; com a mesma notação estequiométrica (Fe_2O_3); são obtidos: Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e Hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Tal diferenciação torna-se imprescindível para a área da química e ciência e engenharia de materiais, visto que na redução da Hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) para Magnetita (Fe_3O_4) pode ocorrer a formação de trincas e microtrincas estruturais, devido o efeito do crescimento anisotrópico da estrutura de espinélio invertido CFC (cúbica de face centrada), o que normalmente implica em uma magnetita resultante mais reativa, do que a magnetita mineral, porém com uma menor resistência mecânica (NOLDIN JUNIOR, 2007; LITTER e BLESÁ, 1992; ALI, SARFRAZ, *et al.*, 2015).

A distinção teórica entre a Maghemita e Hematita dar-se inicialmente pela diferenciação das letras gregas que são agregadas às respectivas fórmulas químicas, assim, a hematita é caracterizada pela letra “ α ” ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a maghemita pela letra “ γ ” ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Além disso, a maghemita possui estrutura cristalina CFC, é um espinélio normal, e apresenta grande similaridade com a Magnetita, sendo inclusive ferromagnética e portanto capaz de ser separada através de concentração magnética ou ser capaz de gerar hipertermia frente a um campo magnético oscilante (LITTER e BLESAS, 1992; ALI, SARFRAZ, *et al.*, 2015).

Quanto à magnetita, é possível caracterizá-la como um óxido de ferro de composição química geral Fe_3O_4 e estrutura cristalina, semelhante à maghemita, CFC do tipo espinélio invertida- XY_2O_4 . Normalmente apresenta coloração cinza escuro à preta; tem peso específico da ordem de 5.16 t/m^3 e é fortemente magnética, propriedade extensamente explorada por métodos mineralógicos e, mais atualmente, na área biomédica. Na magnetita os íons de oxigênio são os responsáveis pela formação de um arranjo cúbico denso de face centrada, gerando dois tipos de sítios de coordenação: a tetraédrica (X) composta por quatro íons de oxigênio, e a octaédrica (Y), composta por seis íons de oxigênio, conforme demonstrada na figura 10 (MIRZA, ALI, *et al.*, 2015).

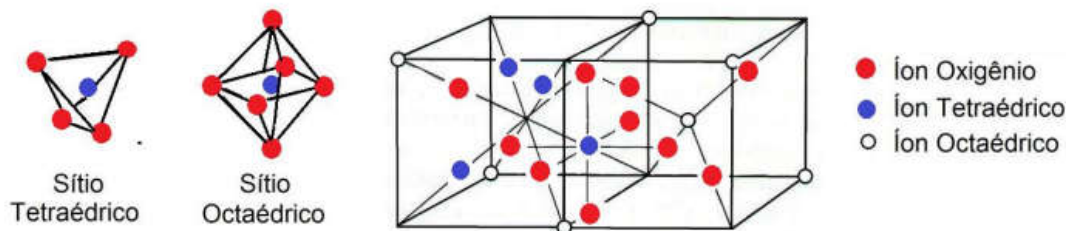


Figura 10. Estrutura Cristalina Espinélio da Magnetita. Figura adaptada de: (COSTA, 2013).

Nos interstícios tetraédricos (X), posicionam-se os íons férricos (Fe^{+3}) e nos interstícios octaédricos (Y), posicionam-se em quantidades iguais os íons férricos (Fe^{+3}) e ferrosos (Fe^{+2}). Tal arranjo resulta em 24 cátions, sendo 16 íons de Fe^{+3} e 8 de Fe^{+2} ; representada pela fórmula molecular $\{(8Fe^{+3})_x[(8Fe^{+2})(8Fe^{+3})]_yO_{32}\}$, obtendo-se a célula unitária da magnetita. Normalmente na consideração de uma magnetita perfeita o número de átomos do Fe^{+3} é igual ao dobro do Fe^{+2} , entretanto, frequentemente, este óxido apresenta uma estrutura não estequiométrica (MIRZA, ALI, *et al.*, 2015; COSTA, 2013).

2.5. Hipertermia

O termo hipertemia, de acordo com a etimologia e semântica da palavra, significa:

*“Hipertemia: Elevação da temperatura de um organismo acima do normal (superior a 38 °C); estado febril. Do grego **hypérthermos**: “quente de mais” + -ia”* (FERREIRA, 2010).

Hipócrates (460-370 a.C.) acreditava que qualquer doença poderia ser curada pelo aquecimento do organismo vivo. Dentro desta filosofia, a hipertermia oncológica, uma modalidade de tratamento de câncer com elevação de temperatura local entre 41 e 45 °C com um tempo de tratamento de no mínimo 30 min; tem ganhado considerável atenção devido a sua eficácia clínica, tal como minimizar efeitos locais clínicos e a possibilidade de destruir seletivamente tumores malignos localizados ou profundamente enraizados. Em termos clínicos, de maneira mais ampla, a hipertermia consiste em um procedimento terapêutico, cujos tecidos são aquecidos acima dos limites da temperatura fisiológica normal e baseia-se no aumento da temperatura, entre 41 e 46 °C, de uma determinada região do corpo (NAZIR, HUSSAIN, *et al.*, 2014).

Dependendo da faixa de temperatura, o entendimento do tratamento por hipertermia pode ser dividido em três classificações diferentes:

- a) Diatérmica: compreende tratamentos com utilização de temperaturas até 41 °C. Amplamente utilizada nos tratamentos fisioterápicos para processos crônicos e sub-agudos, como em agravos reumatológicos.
- b) Hipertermia Moderada: considerada a “tradicional” faixa do tratamento por hipertermia, portanto, quando se aplica a denominação “hipertermia” entende-se que se refere ao espectro moderado. Compreende temperaturas entre 41 °C até 46°C, sendo amplamente utilizada em tratamentos oncológicos.
- c) Termoablação: Caracteriza-se pela aplicação de temperaturas entre 47 °C e 56 °C. Técnica indicada quando se deseja necrose tecidual direta, o que limita sua utilização para tratamentos mais tradicionais com magnetohipertermia, por exemplo (THORAT, LEMINE, *et al.*, 2016).

O tratamento por hipertermia, classicamente considerada a faixa moderada, normalmente é empregado em neoplasias, uma vez que as células tumorais, geralmente, são estruturas primitivas, caóticas, com menos suprimento sanguíneo e com crescimento desordenado, sendo consideradas mais frágeis que as células ditas normais. A desestruturação das células oncológicas resulta, comumente, em áreas destituídas de nutrientes, com baixas

concentrações de oxigênio (hipóxia) e altamente ácidas, o que, em geral, as tornam mais sensíveis e suscetíveis ao efeito citotóxico do calor. Nesse sentido, o aumento de temperatura tende a alterar a síntese de DNA e RNA; enfraquece os sistemas enzimáticos celulares necessários para o metabolismo e para a divisão celular; desestabiliza algumas proteínas celulares e, assim, causam a morte da célula (WOLF, 2015).

A hipertermia pode ser alcançada pela aplicação de laser, radiofrequência, microondas, ultrassom, infravermelho ou implantes ferromagnéticos e complementa tratamentos atualmente disponíveis, incluindo quimioterapia, radioterapia, cirurgia, terapia genética e imunoterapia para o câncer (PITAKSUTTEEPONG, 2016).

O grande desafio da indução de calor (aumento de temperatura) em pacientes com câncer, por exemplo, baseia-se na dificuldade de aplicar ou gerar calor localmente sem, contudo, danificar as células normais vizinhas. Nesse sentido, as nanopartículas magnéticas surgem como agentes alternativos para aquecer especificamente o alvo, preservando os tecidos saudáveis e agindo com seletividade à células-alvos (PITAKSUTTEEPONG, 2016).

A “magnetohipertermia” (hipertemia com nanopartículas magnéticas) tem recebido atenção considerável como uma potencial ferramenta terapêutica para o câncer e outras doenças. Na hipertermia, o alvo ou tecido doente é aquecido durante um período de tempo. Com a hipertermia magnética, o aquecimento é conseguido através da exposição da região de tecido contendo nanopartículas magnéticas a um campo magnético alternado, geralmente com frequência entre 100 e 500 kHz (BRANQUINHO, CARRIÃO, *et al.*, 2013).

Em geral, existem três mecanismos básicos distintos que atribuem à materiais magnéticos o poder da hipertermia frente um campo magnético oscilante:

- (i) circulação de correntes induzidas no material;
- (ii) perda de energia por histerese em materiais de multidomínio e;
- (iii) perda de energia por relaxação em materiais magnéticos superparamagnéticos de monodomínio (SOUZA, 2011).

Os mecanismos (i) e (ii) tendem a pouco contribuir para o aquecimento de partículas com regime de monodomínio. Nesse sentido, o mecanismo significativo para o aquecimento torna-se o de relaxação (iii). A perda de energia por relaxação em nanopartículas magnéticas de monodomínio acontece de dois modos: modo rotacional (de Brown) e modo de Néel. O princípio de geração de calor devido a cada modo individual é mostrado na figura abaixo (b e c) (SOUZA, 2011).

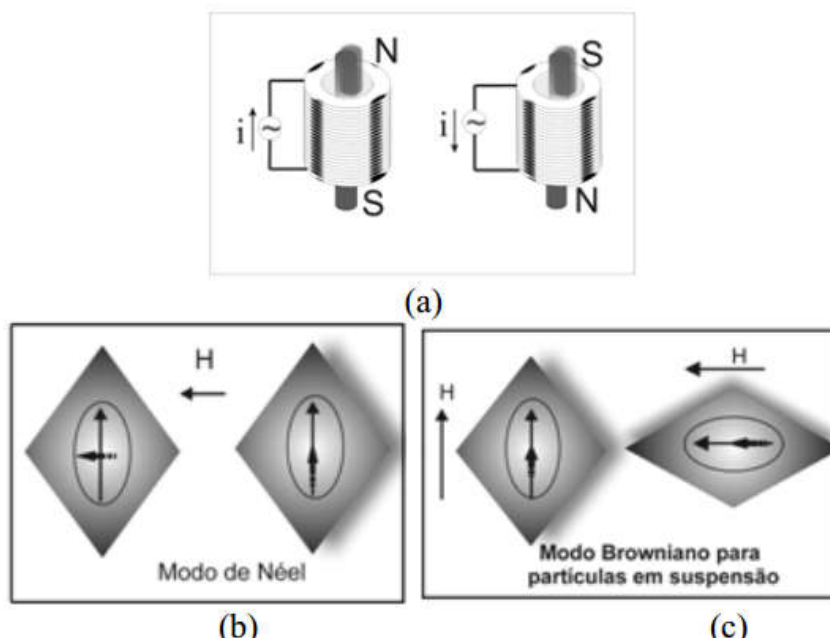


Figura 11. Mecanismos básicos de Hipertermia mediante campo magnético alternado: (a) Esquema de indução para material magnético em uma bobina de corrente alternada; (b) e (c) Perda de energia por relaxação levando ao aquecimento em um campo oscilante; (b) Modo Néel; (c) Modo de relaxação Browniano. Figura adaptada de : (SOUZA, 2011).

No modo de Néel, o momento magnético inicialmente bloqueado ao longo do eixo de fácil magnetização do cristal rotaciona em direção ao campo externo. O mecanismo de Néel é análogo à perda de energia por histerese em partículas magnéticas de multidomínio, já que existe uma “fricção interna” devido ao movimento do momento magnético em um campo magnético externo que resulta na geração de calor. No modo Browniano, a geração de calor se dá através da oscilação das partículas como um todo em direção ao do campo magnético externo, sob o efeito de uma força térmica, contra a viscosidade em uma suspensão. Esse mecanismo representa essencialmente o componente de fricção mecânica das nanopartículas em suspensão (SOUZA, 2011).

Desse modo, as nanopartículas magnéticas, quando exposta à uma campo magnético alternado, dissipam calor através de perdas de relaxação, criando assim o aquecimento localizado dos tecidos. Para aplicações em biologia e medicina, o aquecimento por nanopartículas magnéticas (independentemente do mecanismo) oferece o potencial para uma atividade terapêutica não invasiva e altamente seletiva (BRANQUINHO, CARRIÃO, *et al.*, 2013).

Nesse contexto, a magnetohipertermia permite induzir remotamente o calor local por meio das perdas de energia das nanopartículas magnéticas sob um campo magnético oscilante.

As partículas magnéticas, quando submetidas a um campo magnético alternado (CMA), por meio de processos de perdas energéticas transformam a energia eletromagnética em calor, permitindo, assim, o aumento da temperatura em regiões bem definidas espacialmente, em que as células tumorais e as nanopartículas estão localizadas. Simplificadamente, para induzir a hipertermia direcionada ao alvo, as nanopartículas magnéticas são guiadas e retidas na região tumoral por um gradiente de campo magnético externo (ver figura 12), após a administração. Aplica-se, então um CMA, de intensidade e frequência tal, que a direção de magnetização das partículas seja continuamente revertida, gerando calor necessário para produzir a lise das células tumorais. Se essa temperatura puder ser mantida na faixa preferencial de 42 – 44°C, por aproximadamente 30 min ou mais, acredita-se que o tumor poderá ser total ou parcialmente destruído. A minimização dos danos aos tecidos normais circunvizinhos faz da magnetohipertermia uma técnica promissora para o tratamento oncológico, em seus diversos tipos e níveis (CASTRO e QUEIROZ, 2012).

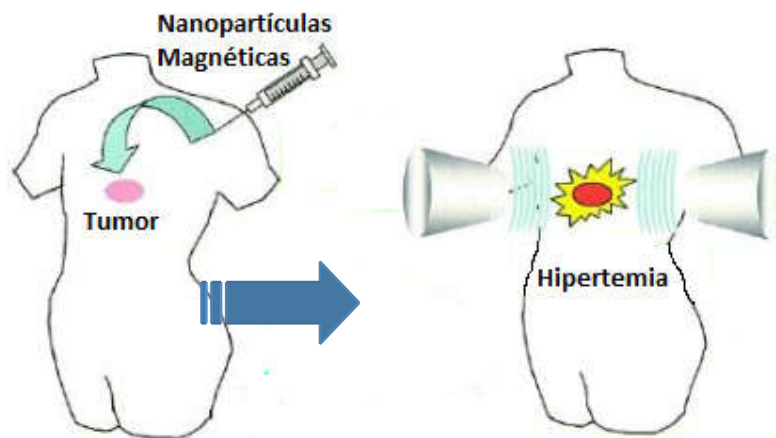


Figura 12. Ilustração esquemática de estratégias terapêuticas usando nanopartículas magnéticas: hipertermia. Figura baseada em: (CASTRO e QUEIROZ, 2012).

Desse modo, a hipertermia gerada pelas nanopartículas, além de tornar ótima a temperatura para o sistema imune, ser considerada não tóxica, biocompatível, poder ser injetável e possuir efetiva absorção à energia do campo magnético alternado. Além disso, essa hipertermia também afeta negativamente células cancerígenas e, possivelmente parasitadas, já que células infectadas também demonstram maior sensibilidade ao calor que células normais. Nesse contexto, tais células podem ser alvo de nanopartículas específicas, e a hipertermia pode ser utilizada visando o aumento da eficiência de tratamento em situações infectivas e/ou parasitárias (HACHTEL, YU, *et al.*, 2016).

2.7. Ondas Curtas

A Fisioterapia é um ramo da área da saúde que tem por objetivo propiciar reabilitação de patologias e transtornos, independência funcional, prevenção de agravos, promoção da saúde geral, inclusão social e melhora na qualidade de vida.

De acordo com o Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional (COFFITO), órgão máximo nacional que regulamenta a profissão, é possível definir o termo fisioterapia como:

“Uma ciência da saúde que estuda, previne e trata os distúrbios cinéticos funcionais intercorrentes em órgãos e sistemas do corpo humano, gerados por alterações genéticas, por traumas e por doenças adquiridas, na atenção básica, média complexidade e alta complexidade. Fundamenta suas ações em mecanismos terapêuticos próprios, sistematizados pelos estudos da biologia, das ciências morfológicas, das ciências fisiológicas, das patologias, da bioquímica, da biofísica, da biomecânica, da cinesia, da sinergia funcional, e da cinesia patológica de órgãos e sistemas do corpo humano e as disciplinas comportamentais e sociais” (COFFITO, 2016).

Nesse sentido, alguns dos mecanismos terapêuticos mais aceitos e utilizados na prática clínica da fisioterapia estão inclusos no espócio dos recursos eletrotermofototerapêuticos, os quais proporcionam, em linhas gerais, a aplicação de algum recurso termo, elétrico, químico e/ou físico para obtenção de um efeito fisiológico; os quais incluem desde uma simples diminuição de sinais flogísticos até uma complexa estrutura processual para a contração de grupos musculares e a decorrente obtenção do movimento. (MESSIAS, OKUNO e COLACIOPPO, 2011).

As correntes e campos eletromagnéticos de alta frequência (ondas curtas contínuas, pulsadas e microondas) são exemplos de recursos utilizados na fisioterapia para a obtenção de efeitos analgésicos, antiinflamatórios, antiespasmolíticos e hiperemiantes; os quais são observados classicamente em termoterapias por meio da aplicação de calor (diatermia). Artigo velho (TEIXEIRA, MESSIAS, *et al.*, 2001).

Em termos gerais, a diatermia pode ser conceituada como a aplicação de energia eletromagnética de alta frequência, visando a geração de calor em tecidos corporais. O calor é, então, produzido pela movimentação de átomos e moléculas que foram expostos ao campo

eletromagnético, e como resultado ao aumento da agitação dessas partículas, há o aumento da temperatura local. Esse aumento de temperatura tende a aumentar o fluxo sanguíneo, dilatar vasos e capilares, aumentar a filtração e difusão (através de diferentes membranas), elevar a taxa metabólica tecidual, alterar reações enzimáticas e propriedades físicas de tecidos fibrosos (tal como os encontrados em cicatrizes). O calor tende ainda a diminuir a rigidez articular; promover, em muitos casos, o relaxamento muscular; alterar o limiar doloroso e aumentar a reabilitação de lesões, sobretudo em casos subagudos e crônicos (PRENTICE, 2014; TEIXEIRA, MESSIAS, *et al.*, 2001).

Como agente terapêutico, no campo da fisioterapia, a diatermia tende a ser aplicada em duas maneiras distintas: diatermia por ondas curtas e por microondas. A diatermia por ondas curtas pode ser subdividida em contínua ou pulsada, sendo a modalidade contínua a mais utilizada tanto no quesito temporal como de aplicabilidade, já que está relacionada ao tratamento de uma variedade de lesões e agravos (PRENTICE, 2014).

A frequência das oscilações da terapia por Ondas Curtas contínua foi estabelecida, por um acordo internacional, na *Conferência de Atlantic City* em 1947, para ser fixada em **27,12 MHz**, diferenciando-a das frequências utilizadas em atividades transmissoras. Tal fixação de emissão é utilizada até os dias atuais, independentemente da modalidade de terapêutica (contínua ou pulsada) (TEIXEIRA, MESSIAS, *et al.*, 2001).

A terapia por ondas curtas pulsadas foi desenvolvida por Ginsberg em 1940, porém com utilização limitada até 1959, data em que foram construídos os primeiros aparelhos que emitiam energia eletromagnética pulsada com frequência de 27,12 MHz de modo padronizado e seguro. Em linhas gerais, a opção pela modalidade pulsada é mais utilizada quando se deseja obter efeitos fisiológicos atérmicos, os quais ocorrem frequentemente em nível celular, sendo relacionado ao potencial de membrana (MESSIAS, OKUNO e COLACIOPPO, 2011).

Nesse entendimento, as células lesionadas por um agravo tendem a sofrer uma despolarização, a qual gera uma disfunção celular e altera a divisão, proliferação e capacidade regenerativa da mesma. Assim, pressupõem-se que a aplicação do ondas curtas repolarizariam as células danificadas, corrigindo a disfunção celular (MESSIAS, OKUNO e COLACIOPPO, 2011).

A diatermia por Ondas Curtas é obtida, na prática clínica, por meio de um aparelho de igual nome (Ondas-Curtas), cujo objetivo é a emissão de campo eletromagnético alternado em tecidos humanos, com emprego de ondas eletromagnéticas não ionizantes de alta frequência e pequeno comprimento de onda. Conseqüentemente, essa aplicação de campo eletromagnético

alternado produz calor nos tecidos corporais situados profundamente, levando a geração dos efeitos térmicos relacionados pela termoterapia profunda (MESSIAS, OKUNO e COLACIOPPO, 2011).

O aparelho de ondas curtas consiste, simplificada, em um equipamento elétrico com oscilador de frequência de radio, amplificador de potencia, reservatório de produção de ressonância e eletrodos, conforme figura 13. Esse oscilador fornece estabilidade e oscilações de fluxo livre estáveis, na frequência solicitada. O amplificador gera a potência exigida para acionar diferentes tipos de eletrodos. O reservatório de ressonância de produção sintoniza o paciente como parte do circuito e permite que lhe seja transferida potência máxima.

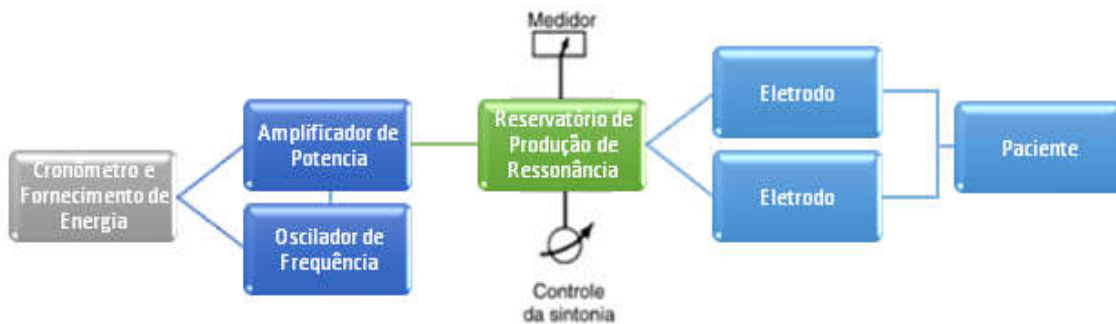


Figura 13. Ilustração esquemática dos componentes básicos de um aparelho de ondas curtas.
Figura baseada em: (PRENTICE, 2014).

Em resumo, o Ondas Curtas fornece radiação não-ionizante da porção de frequência de rádio do espectro eletromagnético, sendo utilizada para produzir calor nos tecidos corporais situados profundamente. A banda de ondas de rádio frequência é de 27,12 MHz e a presença de um campo eletromagnético cria correntes elétricas diminutas e um campo magnético dentro dos tecidos, que são os responsáveis pelos efeitos fisiológicos do Ondas Curtas. (PRENTICE, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi desenvolver e caracterizar nanopartículas de óxido de ferro (maghemita), revestidas com substâncias atóxicas e biocompatíveis (ácido glicurônico e frutose), associadas à hipertermia por ondas curtas, a fim de avaliar, em nível experimental, um potencial método para o tratamento de lesões de leishmaniose cutânea.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar soluções de nanopartículas de maghemita e revesti-las com ácido glicurônico e frutose.
- Caracterizar as nanopartículas de óxido de ferro por meio das técnicas: DSC; microscopia eletrônica (MEV-FEG); espectroscopia de Mössbauer; FTIR; Análises térmicas (TGA/DSC); magnetometria de amostra vibrante (VSM) e ensaio de magneto hipertermia.
- Avaliar a eficiência de aquecimento das nanopartículas e a concentração ideal para obtenção de hipertermia, através de aplicação de ondas curtas.
- Avaliar a eficácia leishmanicida do método proposto, por meio de bioensaios *in vitro* em formas promastigotas de Leishmania.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Visando atingir os objetivos do presente trabalho foi proposta uma metodologia, apresentada no organograma a seguir (Figura 14), que consiste em três etapas distintas: I- Síntese das nanopartículas; II- Caracterização das nanopartículas e III- Bioensaio de atividade leishmanicida *in vitro*.

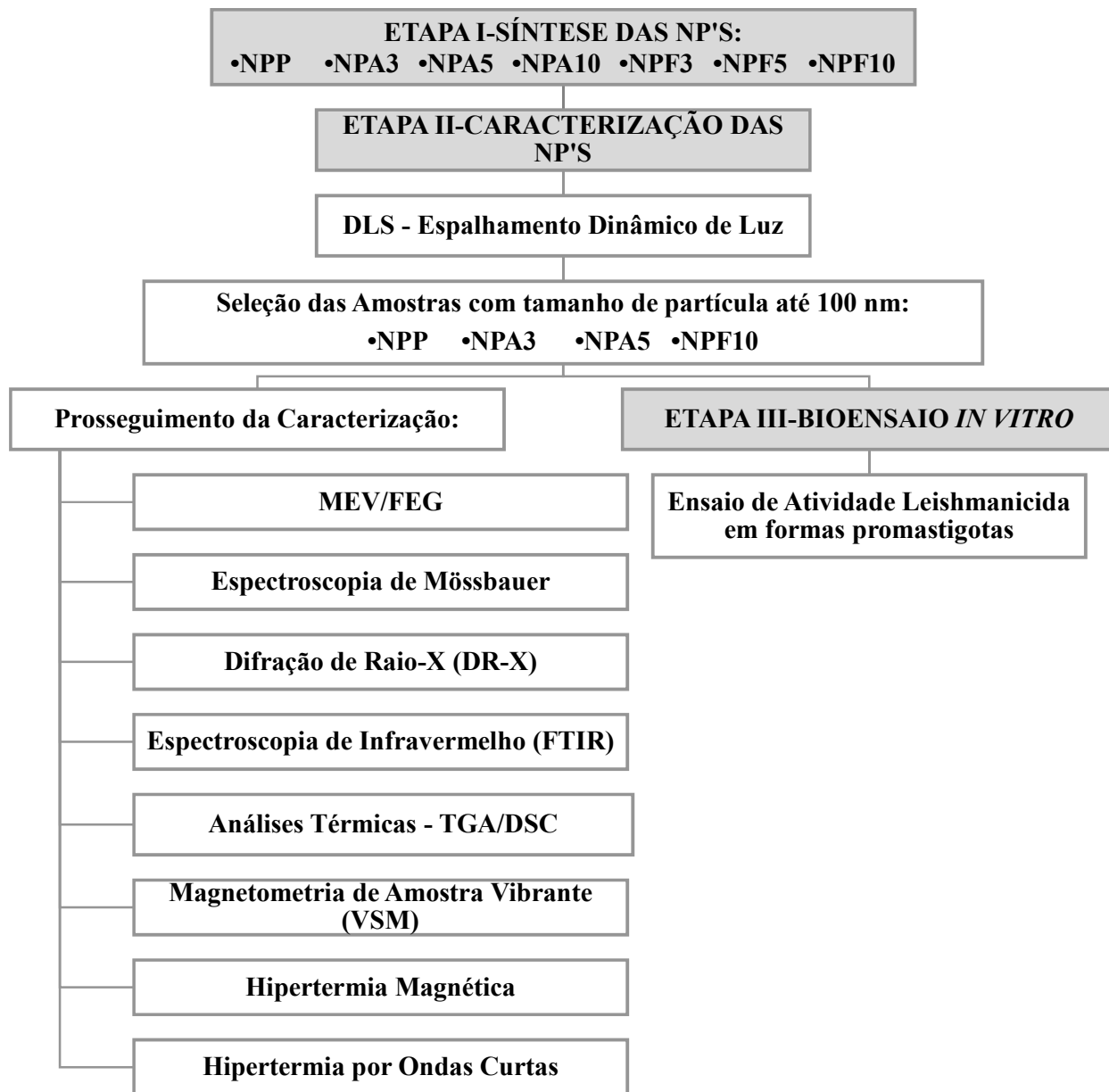


Figura 14. Organograma metodológico. NP's= nanopartículas; NPP = solução de NP's de óxido de ferro sem revestimento (solução precursora); NPA3= NP's revestidas com ácido glicurônico na proporção 1:3 (Fe:Ácido); NPA5= NP's revestidas com ácido glicurônico na proporção 1:5 (Fe:Ácido); NPA10= NP's revestidas com ácido glicurônico na proporção 1:10

(Fe:Ácido);NPF3= NP's revestidas com frutose na proporção 1:3 (Fe:Frutose); NPF5= NP's revestidas com frutose na proporção 1:5 (Fe:Frutose); NPF10= NP's revestidas com frutose na proporção 1:10 (Fe:Frutose); DLS= *Dynamic Light Scattering*; MEV/FEG=Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de elétrons; FTIR= *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*; VSM= *Vibrating Sample Magnetometry*; TGA= *Thermogravimetric Analysis* (Análise Termogravimétrica); DSC= *Differential Scanning Calorimeter* (Calorimetria Exploratória Diferencial).

4.1. ETAPA I: SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

4.1.1 Síntese de Nanopartículas de Maghemita

Existem vários métodos para produzir nanopartículas revestidas, incluindo a co-precipitação, meios sol-gel não-aquosos e aquosos, microemulsão e processos sonoquímicos hidrotérmicos/solvotérmicos, que normalmente produzem resultados aceitáveis para as aplicações biomédicas.

Entre as sínteses de fase aquosa, o método de co-precipitação é amplamente utilizado por sua simplicidade, com o produto final, tipicamente compreendendo tanto fases de óxido de ferro de magnetita (Fe_3O_4) quanto maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Esse método fornece também facilidade na preparação de nanopartículas com revestimentos hidrofílicos, para sínteses em um único recipiente (*one-pot*). O inconveniente, entretanto, da síntese em fase aquosa é que as variações nas razões molares dos sais de ferro, muitas vezes, resultam em alterações da estrutura cristalina das nanopartículas e o produto final é, muitas vezes, uma mistura de magnetita e maghemita. Contudo, reações em condições controladas, sobretudo em relação à temperatura e atmosfera, tendem a minimizar tal efeito, produzindo nanopartículas puras; além disso, mesmo que o produto obtido se caracterizasse como uma mistura de óxidos (magnetita e maghemita), isso pouco afetaria o potencial de aquecimento por campo eletromagnético alternado (derivado do ondas-curtas), tendo em vista que ambas as partículas são magnéticas e propensas à endocitose e estimulação à hipertermia (SCHETTINO JÚNIOR, 2009).

Dessa forma, a estrutura para o desenvolvimento das nanopartículas foi baseada em método de co-precipitação (oxidação-precipitação) em fase aquosa, fundamentada pela metodologia proposta por MASOTI, PITTA, *et al.*, 2009, em que magnetopolímeros foram sintetizados por meio da técnica de Schlenk. A síntese das nanopartículas de maghemita, nesse caso, foi desenvolvida de modo a assegurar que a mistura reacional fosse desenvolvida, em partes, sob atmosfera de gás inerte, no qual foi utilizado o argônio. Todo o processo de

síntese foi realizado no Departamento de Química Inorgânica da Universidade de Helsinki/Finlândia, via projeto VAIKUTUS, sob coordenação do professor Andriy Grafov.

A opção pela não utilização de todo o processo reacional sob atmosfera inerte seu deu devido à obtenção do produto final, o qual quando em total atmosfera inerte tem maior tendência a formação de magnetita. Já quando em contato com o ar atmosférico (com maior concentração de oxigênio) a probabilidade de formação da maghemita é maior, sendo esta última fase desejada dentre dos possíveis óxidos de ferros a serem formados.

A predileção pela maghemita é devida sua estabilidade química em comparação à magnetita. A maghemita, em muitos casos, é o produto principal da oxidação da própria magnetita e, nessa situação, a obtenção de um óxido mais estável e não suscetível a oxidação espontânea à baixas temperaturas, faz com que não haja a formação de sub-produtos indesejados, especialmente em aplicações biomédicas, nas quais substância indesejadas podem ser tóxicas e atuar negativamente para efetividade das nanopartículas, como no caso do referido trabalho, que visa aplicação da maghemita para obter hipertermia e conseqüente efeito leishmanicida (SERNA e MORALES, 2013).

Diante do exposto, o processo de síntese das nanopartículas de maghemita utilizou os seguintes reagentes, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de maghemita.

Reagentes	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	Fabricante	Pureza	Observações
Sulfato de Ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	Merck's Reagenzien	99%	Heptahidratado
Cloreto de Ferro III	FeCl ₃ .6H ₂ O	270,15	Sigma-Aldrich	97%	Hexahidratado
Hidróxido de Amônio	NH ₄ OH	34,99	VWR	25%	_____

Nesse processo, 4,6g (0,017 mmol) de FeCl₃.6H₂O (cloreto de ferro III hexahidratado) e 2,365g (0,0085 mmol) de FeSO₄.7H₂O (sulfato de ferro heptahidratado) — respeitando a proporção de 2:1, respectivamente — foram dissolvidos em 200mL de água MilliQ (ultrapura) deaerada (degasada), em que vácuo e argônio foram utilizados intercaladamente por dez ciclos. Posteriormente, a mistura foi agitada vigorosamente e então alcalinizada com 6,25 mL de NH₄OH 25 % (hidróxido de amônio à 25 %). Em sequência, a agitação foi mantida, aquecendo-se a mistura à 80 °C por 1 hora, com temperatura constante. Por fim, a mistura foi deixada arrefecer “overnight” no agitador magnético e então dializada duas vezes

por meio de membrana celular tubular de diálise de 76 mm da marca *Sigma-Aldrich*. O produto final foi uma solução transparente, com precipitado de coloração marrom enegrecida e características magnéticas, comprovadas pela aproximação de um ímã (magneto) com o respectivo deslocamento do precipitado (nanopartículas de óxido de ferro - NPOF) em direção ao magneto (Figura 15).

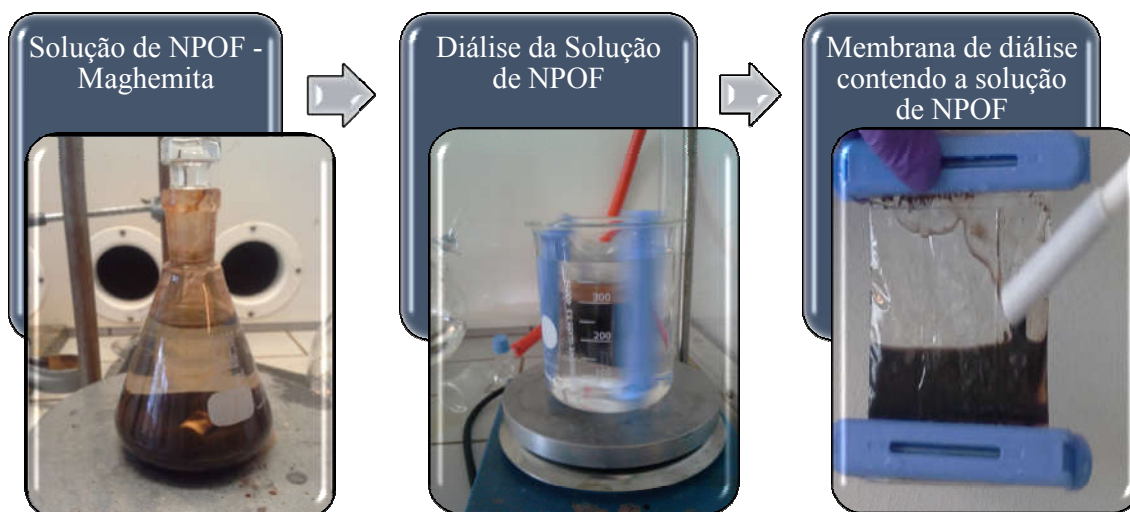


Figura 15. Imagem da solução final das nanopartículas de maghemita com seu respectivo processo de diálise e caráter magnético. NPOF= Nanopartículas de óxido de ferro.

Após a diálise o pH da solução foi mensurada por pHmêtro da marca QUIMIS® (modelo Q400AS), indicando neutralidade da solução formada (6,45). A solução também foi corrigida quanto à concentração, já que durante o processo de diálise a mesma ficou mais concentrada (volume final de 160 mL), acrescentando-se nesse caso, um adicional de 40 mL de água MilliQ. A Figura 16 apresenta um fluxograma com a metodologia resumida da síntese.

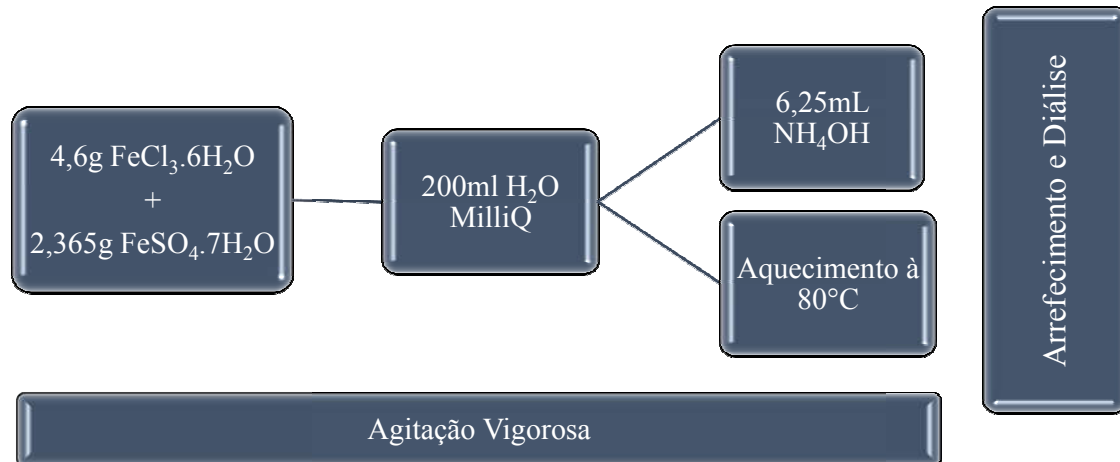


Figura 16. Fluxograma demonstrando a metodologia resumida de síntese das nanopartículas de maghemita.

4.1.2. Síntese das Nanopartículas de Maghemita Revestidas

As nanopartículas revestidas com ácido D-Glicurônico e D-Frutose foram sintetizadas a partir de uma solução precursora de nanopartículas de maghemita, em que os reagentes utilizados estão elencados na Tabela 4.

Tabela 4. Reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido D-Glicurônico e D-Frutose.

Reagentes	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	Fabricante	Pureza	Observações
Sulfato de Ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	Merck's Reagenzien	99%	Heptahidratado
Cloreto de Ferro III	FeCl ₃ .6H ₂ O	270,15	Sigma-Aldrich	97%	Hexahidratado
Hidróxido de Amônio	NH ₄ OH	34,99	VWR	25%	_____
Ácido D-Glicurônico	C ₆ H ₁₀ O ₇	194,13	Sigma-Aldrich	99%	_____
D-Frutose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	Sigma-Aldrich	≥ 99%	_____

Para a síntese, cada ligante foi utilizado seguindo as concentrações de proporção de ferro total teórico para ácido ou frutose, nas dimensões de: 1:3; 1:5 e 1:10, de acordo com cálculos estequiométricos, cuja concentração de ferro total teórico da solução precursora é

7,1 mg/mL. Isso prediz que as NPOF com ligantes na concentração 1:3 apresentam maior concentração de ácido ou frutose adicionados.

Utilizou-se, portanto, 30 mL da solução precursora de NPOF para cada proporção, em que foram adicionados os respectivos ligantes e cada solução foi deixada no shaker por 4 horas.

Desse modo, foram obtidas as seguintes soluções, observadas na Tabela 5.

Tabela 5. Soluções sintetizadas com ácido D-Glicurônico e D-Frutose, a partir de 30 mL da solução precursora de nanopartículas de óxido de ferro.

Nomenclatura da Solução	Ligante	Proporção	Quantidade adicionada à síntese	Concentração de ferro total	Concentração de ligante
Solução NPA3	Ácido D-Glicurônico	1:3	246,18mg (≈0,246g)	7,1mg/mL	8,20mg/mL
Solução NPA5	Ácido D-Glicurônico	1:5	147,81mg (≈0,148g)	7,1mg/mL	4,92mg/mL
Solução NPA10	Ácido D-Glicurônico	1:10	73,89mg (≈0,074g)	7,1mg/mL	2,46mg/mL
Solução NPF3	D-Frutose	1:3	228,6mg (≈0,229g)	7,1mg/mL	7,62mg/mL
Solução NPF5	D-Frutose	1:5	137,28mg (≈0,137g)	7,1mg/mL	4,57mg/mL
Solução NPF10	D-Frutose	1:10	68,64mg (≈0,069g)	7,1mg/mL	2,28mg/mL

4.2. ETAPA II – CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As amostras foram caracterizadas estruturalmente e magneticamente, através da aplicação de diversas técnicas, tais como: Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS- *Zetasizer*); Microscopia Eletrônica de Varredura por Canhão de Emissão de Elétrons por Campo — “*Field Emission Gun*” — (MEV-FEG); Difração de Raio-X (DR-X); Espectroscopia de Mössbauer; Espectroscopia de Infravermelho (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*); Análises Térmicas (TG/DSC – *Thermogravimetry/Differential Scanning Calorimeter*); Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM – *Vibrating Sample Magnetometry*) e Magneto Hipertermia.

4.2.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS- *Zetasizer*)

Todas as soluções foram primeiramente analisadas pelo aparelho *Zetasizer NanoZS* (Modelo: ZEN3600; Marca: Malvern Instruments), que realiza medições de tamanho de

partícula, através do processo de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS); o qual mensura o movimento Browniano e o correlaciona com o tamanho das partículas. O DLS é uma técnica não invasiva para medição do tamanho e da distribuição do tamanho em moléculas ou soluções de partículas, normalmente na região dos submicrométrica (MALVERN INSTRUMENTS, 2009).

As medidas do DLS foram realizadas à 23 °C, com absorção de 0,9 e foi adotado o índice de refração da maghemita, seguindo os critérios de ZUNZ *et al.*, 2003, de 2,631. Os resultados do tamanho de partícula foram plotados em gráficos de distribuição de intensidade e serviram de base para a seleção das melhores amostras, que seguiram para caracterização nas demais técnicas e posteriores ensaios biológicos.

É importante ressaltar que, o aparelho analisa a quantidade de luz dispersada pelas nanopartículas e fornece um resultado de distribuição de volume e intensidade, isto porque nanopartículas grandes dispersam muito mais luz do que as partículas pequenas, logo a intensidade é uma média aproximada e, pode estar superestimada, sendo necessária a realização de microscopias que confirmem ou elucidem mais fidedignamente o real tamanho de partículas para as amostras. Portanto, a fase seguinte do processo metodológico foi a caracterização das amostras selecionadas por MEV-FEG.

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura por Canhão de Emissão de Elétrons (MEV-FEG)

As análises do tamanho, distribuição de tamanho e morfologia foram realizadas via microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de elétrons (MEV-FEG), utilizando o microscópio eletrônico S-4800 HITACHI (Hitachi High-Tecnologies Corporation/JAPAN), do laboratório de microscopia no Departamento de Química Inorgânica da Universidade de Helsinki/Finlândia (Figura 17).

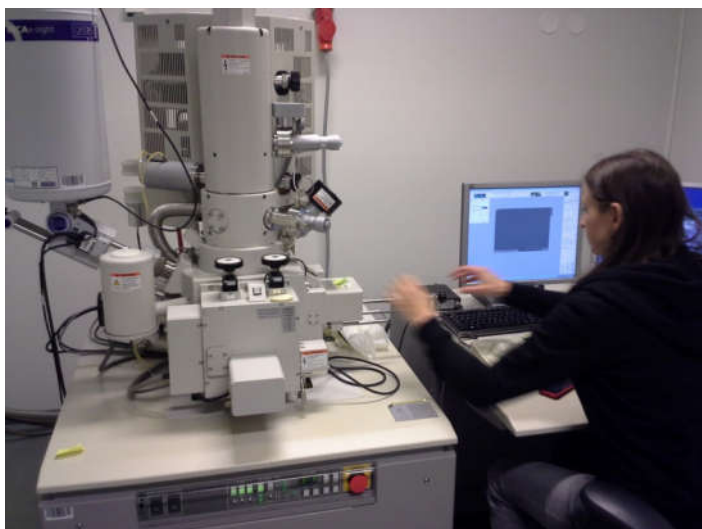


Figura 17. Microscópio eletrônico S-4800 HITACHI no momento da realização do ensaio.

As amostras foram primeiramente diluídas na proporção de 1:10, em que 100 μ L de solução foi diluída em 1000 μ L (1mL) de água MilliQ. Após este procedimento, uma gota de cada dispersão foi depositada sobre uma fita de carbono no anteparo para ensaio e deixada secar no fluxo da capela por 12 horas (Figura 18). Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao microscópio, onde as imagens foram obtidas e então analisadas no software de imagem ImageProPlus 6.0.



Figura 18. Amostras preparadas para a microscopia eletrônica.

4.2.3. Difração de Raio-X

A caracterização das fases cristalinas presentes nas soluções de nanopartículas foi realizada através da técnica de difração de raios-X (DR-X). O ensaio foi realizado em lâmina de vidro (sílica), em que uma alíquota de 400 μ L de cada solução foi deixada secar em fluxo contínuo, overnight, obtendo-se um material em estado sólido (pó), conforme Figura 19.

Uma amostra da solução precursora lavada também foi caracterizada pelo DR-X, em que 1 mL da solução foi lavada duas vezes com 40 mL de água MilliQ na centrífuga, à 5000 rpm por 15 minutos cada ciclo, a fim de obter nanopartículas isoladas, sem a interferência de possíveis cloretos formados ou de outras substâncias associadas. Após esse processo, a mesma alíquota foi retirada e deixada secar overnight (seguindo o padrão das demais amostras). O procedimento de lavagem não foi reproduzido para as NP's com revestimentos, uma vez que isso poderia ocasionar a retirada dos ligantes ou mesmo interferir na adsorção deles.

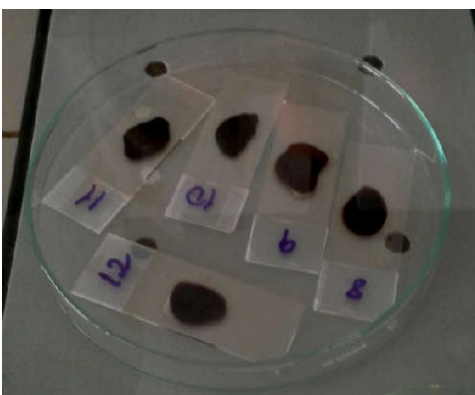


Figura 19. Preparação das soluções para análise no DR-X

As análises foram realizadas no Departamento de Química Inorgânica da Universidade de Helsinki/Finlândia, via projeto VAIKUTUS. O equipamento utilizado foi o modelo X'Pert PRO da marca PANalytical e a condições de análise seguiram os critérios a seguir: campo de varredura de 15° a $65,08^\circ$ para 2θ ; velocidade de varredura de $3^\circ/\text{min}$; passo de $0,08^\circ$; velocidade de varredura de $0,2667^\circ/\text{s}$, tubo de Cu ($\lambda = 1,54056\text{\AA}$) como fonte primária de raios-X; tensão de 45 kV e corrente e 40 mA. Os picos foram identificados por comparações com as cartas padrões compiladas pelo *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS) e cadastradas no *International Center for Diffraction Data* (ICDD). O software utilizado para a identificação foi o X'Pert Core, versão 2.0. A Figura 20 demonstra o aparelho utilizado e as amostras inseridas no mesmo.



Figura 20. (a): Aparelho de Difração de Raio-X, modelo X’Pert PRO da marca PANalytical. (b): Lâmina de vidro, contendo amostra do material, inserida no aparelho no momento do ensaio.

4.2.4. Espectroscopia de Mössbauer

As medidas de espectroscopia Mössbauer foram utilizadas para investigar as formas químicas do ferro presente nas amostras, o percentual de cada fase, a cristalização das fases e o estado de oxidação do ferro.

Para tal análise foi necessário, primeiramente, a obtenção de um material em estado sólido. Nesse caso, 1 mL de cada solução foi centrifugada à 20 °C e 9000 rpm, por 10 minutos, o que permitiu a obtenção de um precipitado de nanopartículas. Posteriormente, o material precipitado foi colocado para secar em temperatura ambiente por 48 horas, em fluxo contínuo na capela, garantindo a forma de pó para análise.

As amostras dos pós foram então inseridas no porta-amostras do equipamento de espectroscopia de Mössbauer e as caracterizações foram obtidas em temperatura ambiente (aproximadamente, 300 K), via espectrômetro por transmissão do ^{57}Fe da marca Wissel (Alemanha), modelo W304 e uma fonte radioativa de $^{57}\text{Co/Rh}$, com atividade da fonte na ordem de 15 mCi. A velocidade do espectrômetro foi determinada tomando como referência o ferro metálico (^{57}Fe) (Figura 21). Os espectros gerados foram analisados com o software “Normos” (Alemanha), sendo todas as etapas ligadas à espectroscopia de Mössbauer realizadas no Laboratório de Espectroscopia do Departamento de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob supervisão do Professor Dr. Marco Morales.



Figura 21. Espectrômetro de Mössbauer (Marca: Wissel/Modelo: W304).

4.2.5. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

As medidas de espectroscopia de infravermelho — FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) — foram realizadas em um espectrofotometro IR Trace Shimadzu (detector TGS), contendo acessório de ATR com cristal de ZnSe e 32 interferogramas por espectro com resolução de 4 cm^{-1} (Figura 22). Para tanto, uma alíquota de $50\mu\text{L}$ de cada material (incluindo as soluções de nanopartículas e ligantes) foi depositada sobre o cristal de mensuração e seco ao fluxo de ar. É importante salientar que a concentração de frutose e ácido glicurônico foi baseada nas proporções utilizadas para as respectivas sínteses, na proporção de 1:10 e 1:5, respectivamente.

O software Fytik 0.91 foi utilizado para realização das deconvoluções (análises) e o OriginPro8 para a conformação dos gráficos. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Eletroquímica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).



Figura 22. Espectrômetro de infravermelho (IR Trace Shimadzu).

4.2.6. Análises Térmicas (TG/DSC)

A Análise Termogravimétrica — TG (*Thermogravimetric Analysis*) — permite a análise da perda ou agregação de massa à amostra analisada, por meio de mensurações de alterações de massa, sob atmosfera definida, em função da variação da temperatura e/ou tempo. A Calorimetria Exploratória Diferencial — DSC (*Differential Scanning Calorimeter*) — proporciona a mensuração da variação de entalpia que ocorre entre a amostra e uma referência durante o processo de aquecimento/resfriamento. Como resultados, a amostra apresentará eventos térmicos de acordo com suas características físicas ou químicas e sua natureza exotérmica ou endotérmica (BERNAL, COUTO, *et al.*, 2002; CAVALHEIRO, IONASHIRO, *et al.*, 1995).

Nesse contexto, as análises de Termogravimetria — TG e DSC — foram realizados no Laboratório de Ensaios Físico-Químicos da Faculdade de Tecnologia/UFAM. O equipamento utilizado foi um SDT Q600, da TA Instruments (Figura 23), o qual possibilita a realização das duas técnicas simultaneamente na mesma amostra. Os testes foram realizados em cadinhos de alumina de 90 μL , com fluxo de gás nitrogênio 5.0 de 30 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/ min, partindo da temperatura ambiente ($\approx 24^\circ\text{C}$) até 800 °C. Antes, 1 mL de cada solução foi colocada dentro de um dissecador e aplicado vácuo por 5 dias, para a remoção de umidade e obtenção de estado sólido. Os dados adquiridos foram analisados no software TA Universal Analysis, da TA Instruments.



Figura 23. SDT Q600 da TaInstruments.

4.2.7. Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM – Vibrating Sample Magnetometry)

O magnetômetro de amostra vibrante, Figura 24, é um dos equipamentos amplamente utilizados para a prática de caracterizações magnéticas. De modo geral, o magnetômetro é constituído por uma fonte geradora de corrente; amplificador lock-in; eletroímã; bobinas de detecção; sensor de campo magnético; sistema de vibração da amostra e sistema de refrigeração.



Figura 24. Magnetômetro de Amostra Vibrante (Lakeshore).

Para as medidas no VSM, a amostra é fixada em uma das extremidades de uma haste não magnética e colocada para oscilar. A fonte geradora de corrente é acionada gerando um campo magnético. A amostra fica magnetizada devido à aplicação de um campo magnético perpendicular em direção a sua direção de oscilação. Assim, a amostra gera uma voltagem

alternada de mesma frequência nas bobinas de detecção. Essa voltagem é comparada com o sinal de uma amostra padrão de Ni. Os dados coletados pelas bobinas captadoras são armazenadas em um banco de dados no computador acoplado e então os dados gráficos podem ser gerados, por meio de programas específicos (SOUZA, 2015).

As medidas foram realizadas no Laboratório de Caracterização Magnética do Departamento de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em temperatura ambiente; em que foi utilizado o magnetômetro da marca Lakeshore (campo de 5 KOe e 6,92 emu); com parâmetros de análise de: campo de 0 até 5 kOe; passo de 200 Oe; 301 pontos; 66,667 Oe/s (frequência de medição) e tempo de varredura por ponto em torno de 2 segundos. Os dados gerados foram analisados com auxílio do software OriginPro8, onde foram elaborados os gráficos experimentais .

É importante informar, contudo, que antes da realização das medidas magnéticas, o aparelho foi devidamente calibrado com amostra padrão de níquel puro e cada amostra das soluções a serem analisadas foram preparadas para o prosseguimento do ensaio.

Nesse caso, 1 mL de cada solução foi centrifugada à 20°C e 9000 rpm, por 10 minutos, o que permitiu a obtenção de um precipitado de nanopartículas. Posteriormente, o material precipitado foi colocado para secar em temperatura ambiente por 48 horas, em fluxo contínuo na capela, garantindo a forma de pó para análise. Em seguida, as amostras foram pesadas, para a aquisição da magnetização de saturação (emu/g) e obtenção da curva de magnetização versus campo magnético; já que a variável de magnetização de saturação é obtida dividindo-se o momento magnético pelo peso em gramas.

4.2.8. Magneto Hipertermia

As análises em equipamento de magneto hipertermia servem de base para verificação do aquecimento e seu potencial de geração de hipertermia, quando partículas ou nanopartículas magnéticas são expostas à um campo eletromagnético conhecido.

Nesse caso, um equipamento próprio para geração de campo magnético e captação de variação de temperatura nas amostras foi utilizado (Figura 25). O sistema empregado é capaz de gerar campos magnéticos com uma frequência de 100 kHz e amplitude de até 200 Oe, em que o princípio de funcionamento se baseia na seguinte maneira: o gerador de funções emite sinais elétricos de baixa intensidade na forma senoidal para o amplificador de potência, que por sua vez, alimenta a tensão de um circuito ressonante, monitorado por um osciloscópio. O sensor de infravermelho mensura, então, a temperatura da amostra e o sistema de refrigeração

evita que o solenóide aqueça além da temperatura inicial e troque calor com amostra (SOUZA, 2015).

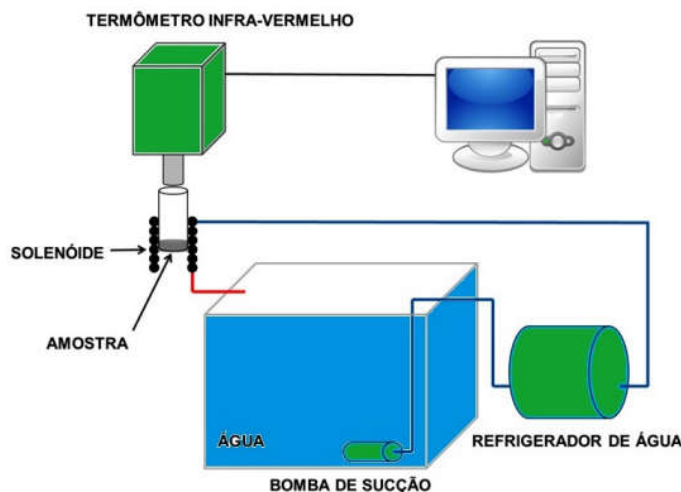


Figura 25. Esquema do Sistema de monitoramento térmico, aquisição de dados e refrigeração do equipamento de magneto hipertermia.

As medidas realizadas foram submetidas à uma frequência de 70 kHz e amplitude de campo de 150 Oe, com tempo de medição de 300 s. Para tanto, 4 mL de cada amostra foi deixada precipitar por 6 horas e 2,5 mL do sobrenadante foi retirado, visando a obtenção de uma solução mais concentrada, já que em situações de aplicação de fármacos fluídos tópicos, (em lesões, por exemplo) o meio aquoso tende a ser dissipado, ficando as nanopartículas mais concentradas. Assim, o equipamento de magneto hipertermia aqueceu 1,5 mL de cada solução, o que minimiza a interferência negativa da água para o real poder de aquecimento das nanopartículas magnéticas, haja visto que o calor gerado pelas mesma será utilizado pelas moléculas de água para o aquecimento, o que interfere negativamente na taxa de hipertermia real. Uma alíquota de 1,5 mL de água milliQ também foi submetida ao referido ensaio de hipertermia; visando um comparativo entre as taxas de aquecimento das nanopartículas com um meio neutro (não magnético).

4.2.9. Definição de Parâmetros para Hipertermia por Ondas Curta

Após os ensaios de magneto hipertermia e consequente verificação de uniformidade de aquecimento das soluções de nanopartículas, optou-se pela realização de ensaios de hipertermia, através da aplicação de campo magnético alternado pelo aparelho de ondas curtas, com apenas a solução precursora (Solução precursora de NPOF). Essas mensurações

foram essenciais para definição dos parâmetros de utilização do aparelho de ondas-curtas (visando a hipertermia com NPOF) e para definição da concentração mais ideal das soluções, quando da realização de bioensaios.

As mensurações foram realizadas com aparelho de ondas-curtas (modelo Diatermed II, da marca CARCI); o aparelho (Figura 26) foi ligado com antecedência de 30 minutos, em tuning (sincronia) de 100%, modo contínuo e intensidade máxima para todos os ensaios. A modalidade contínua foi selecionada devido ao poder térmico que a mesma fornece em detrimento a modalidade pulsada. Um anteparo de plástico garantiu a distância de 6 centímetros entre as placas de eletrodos paralelas que suportavam as amostras de nanopartículas. Não foi utilizado o eletrodo circular tipo Schliephake, porque os braços articulados que o suportam não apresentaram estabilidade. Foi utilizado um termômetro de líquidos em ponteira (da marca INCOTERM), com desvio padrão de 0,5°C e tempo de mensuração de 8 segundos. Não se optou por um termômetro infravermelho, porque este tende a medir apenas a temperatura superficial do líquido, o que poderia não garantir uma medição completa de todo volume.



Figura 26. Aparelho de ondas curtas com sincronia máxima (tunning).

Para o início dos ensaios foram divididas frações da solução selecionada, sendo três níveis a partir da diluição com o meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640 — Sigma, EUA, R-7388) incompleto (sem suplementação de soro bovino fetal – SBF), no qual os bioensaios foram realizados. As diluições/soluções foram classificadas em: (1) Proporção de 1:1 (100µL de nanopartículas para 100µL de meio); (2) Proporção de 1:3 (50µL

de nanopartículas para 150 μ L de meio); e (3) pura, solução apenas de nanopartículas (200 μ L), sem meio. Utilizou-se ainda 200 μ L de meio (puro), que foi ensaiado da mesma maneira das nanopartículas, visando uma observação de referência (controle). A opção por um volume total de 200 μ L se deve à natureza metodológica dos bioensaios, o qual normalmente fixa o volume, também, em 200 μ L.

Os ensaios foram realizados em triplicata para cada solução, em cinco faixas de tempo diferentes (10', 15', 20', 25' e 30' - minutos), com início em temperatura ambiente (T_i), sendo que para cada amostra e cada aferição o tempo era reiniciado. Imediatamente após o término do aquecimento da solução era feita a medição de temperatura, num intervalo de no máximo oito segundos, após esse tempo, a temperatura da solução era acompanhada através de aferição contínua até que retornasse aos níveis basais (tempo de decaimento). Os ensaios foram realizados em ambiente amplo, fechado, com temperatura média em torno de 24°C.

4.3. ETAPA III – BIOENSAIO IN VITRO

Após a definição dos parâmetros de ondas curtas e definição da concentração ideal das soluções a serem utilizados nos bioensaios, prosseguiu-se à realização do ensaios de viabilidade celular.

4.3.1. Ensaios Biológicos de Atividade Leishmanicida

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados através do método de exclusão do azul de Tripán (Sigma) contra as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/09/BR/IM5584), obtida da coleção do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

O azul de Tripán é um corante de alto peso molecular que só é capaz de entrar em células mortas ou que possuam permeabilidade de membrana aumentada. Em termos gerais, a avaliação da viabilidade celular através da exclusão do azul de Tripán consiste em incubar as células por 1 minuto com este corante e quantificá-las com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Hemocitômetro). Células vivas em perfeito estado (membrana impermeável) permanecem incolores enquanto que células mortas ou com a permeabilidade de membrana aumentada são visualizadas em azul.

As formas promastigotas foram cultivadas em um meio bifásico NOVY, MACNEAL E NICOLLE (NNN) suplementada com RPMI-1640 (Sigma, EUA, R-7388). Em seguida, as

promastigotas de *Leishmania* foram cultivados e amplificadas em um frasco de cultura estéril de 25 cm³ contendo meio completo RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (SBFi) [Biobras, Brasil] e 50 µg.mL⁻¹ de gentamicina à 24 ° C. Os parasitos ao final da fase logaritmica/início da fase estacionária foram, então, centrifugados a 4.500 rpm durante 10 min, lavados três vezes com PBS (Phosphate Buffer Saline) e centrifugados à mesma velocidade durante 10 min. A suspensão de parasitas foi diluída com meio de cultura até uma concentração final de 5x10⁶ células/mL.

Diante do exposto, foi realizado inicialmente um delineamento experimental para melhor avaliação estatística e metodológica da eficácia do tratamento proposto. Sendo assim, o estudo caracterizou-se por um Delineamento Experimental Fatorial, em que foram identificadas e setorizadas quatro placas de 96 poços, onde duas placas foram separadas para a aplicação do ondas curtas (OC) e duas sem o uso do respectivo aparelho. Os fatores do delineamento e, conseqüentemente, da Análise de Variância (ANOVA) são descritos como: Substâncias (incluindo as NP's e o controle parasitário); Aplicação do Ondas Curtas e Interação entre os fatores (Interação entre as substâncias e o OC).

A eficácia (E%) do método de tratamento proposto, incluindo a atividade leishmanicida *in vitro* das NP's com e sem o uso do OC, foi obtida por meio da divisão da média de parasitos mortos pela média de parasitos totais, multiplicado por 100 (fator percentilítico) (FRANCO, GRAFOVA, *et al.*, 2016).

Cada dupla do fator “utilização ou não do OC” foi dividida em: 1) Placa Controle — contendo apenas os controles do ensaio (reagentes, meio e parasitas isolados); 2) Placa de Nanopartículas — contendo as soluções das nanopartículas a serem testadas acrescentadas ao meio com parasitas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com poços contendo um volume total de 200 µL e optou-se por utilizar sempre a correlação 1:1 para as soluções de nanopartículas e o meio, seja ele parasitário ou não, conforme resultados obtidos pelos ensaios pregressos de hipertermia por OC.

Assim, os testes formaram as seguintes composições:

- Placa A: Contendo as soluções de nanopartículas acrescentadas do meio parasitário, sem aplicação do aparelho de OC:
 - NPP: 100µL de solução de NPOF precursora acrescentada de 100µL de meio RPMI, com concentração total por poço de 5x10⁶ parasitas/mL.

- NPA3: 100µL de solução de NPOF revestidas com ácido glicurônico, na proporção de 1:3, acrescida de 100µL de meio, com concentração total por poço de 5×10^6 parasitas/mL.
- NPA5: 100µL de solução de NPOF revestidas com ácido glicurônico, na proporção de 1:5, acrescida de 100µL de meio, com concentração total por poço de 5×10^6 parasitas/mL.
- NPF: 100µL de solução de NPOF revestidas com frutose, na proporção de 1:10, acrescida de 100µL de meio, com concentração total por poço de 5×10^6 parasitas/mL.
- Placa B: Contendo as soluções controles acrescidas do meio parasitário, sem aplicação do aparelho de OC:
 - CA3: 100µL de solução de ácido glicurônico, na proporção de 1:3, acrescida de 100µl de meio, com concentração total por poço de 5×10^6 parasitas/mL. Nesse caso, uma solução análoga à correlação de 1:3 (ácido para ferro total – 7,1 mgFe/mL) foi desenvolvida, em que 1mL de água MilliQ dissolveu 8,206mg do ácido, o que gerou a solução controle CA3.
 - CA5: 100µL de solução de ácido glicurônico, na proporção de 1:5, acrescida de 100µl de meio, com concentração total por poço de 5×10^6 parasitas/mL. Nesse caso, uma solução análoga à correlação de 1:5 (ácido para ferro total – 7,1 mgFe/mL) foi desenvolvida, em que 1ml de água MilliQ dissolveu 4,927 mg do ácido, o que gerou a solução controle CA5.
 - CF: 100µL de solução de frutose, na proporção de 1:10, acrescida de 100µL de meio, com concentração total por poço de 5×10^6 parasitas/mL. Nesse caso, uma solução análoga à correlação de 1:10 (frutose para ferro total – 7,1 mgFe/mL) foi desenvolvida, em que 1mL de água MilliQ dissolveu 2,288 mg da frutose, o que gerou a solução controle CF.
 - CM: 200µL de meio sem presença de parasita. Esse controle, chamado de controle positivo, é útil para verificar se houve contaminação nas amostras, já que, caso verifique-se a presença de parasitas no processo de contagem, estará confirmada a intercontaminação ou contaminação por manipulação ou por outros microorganismos.
 - CP: 100µL de meio cultivo celular (RPMI) acrescida de 100µL de meio, com concentração total por poço de 5×10^6 parasitas/mL. Nesse caso, o controle CP

servirá para indicar o potencial leishmanicida do fator de utilização do OC sem a presença de nanopartículas.

- Placa C: Contendo as soluções de nanopartículas acrescidas do meio parasitário, idêntica à Placa A, mas com a utilização do OC.
- Placa D: Contendo as soluções controles acrescidas do meio parasitário, idêntica à Placa B, mas com a utilização do OC.

A Figura 27 demonstra o esquema do delineamento das placas, contendo a localização das soluções, controles e repetições nas placas.

PLACAS SEM OC – Placa A e B												
Placa A – Placa de Nanopartículas sem OC												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C				NPP		NPP		NPP				
D				NPA3		NPA3		NPA3				
E				NPA5		NPA5		NPA5				
F				NPF		NPF		NPF				
G												
H												
Triplicata 1				Triplicata 2				Triplicata 3				
Placa B – Placa Controle sem OC												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				CA3		CA3		CA3				
C				CA5		CA5		CA5				
D				CF		CF		CF				
E				CM		CM		CM				
F				CP		CP		CP				
G												
H												
Triplicata 1				Triplicata 2				Triplicata 3				
PLACAS COM OC – Placa C e D												
Placa C – Placa de Nanopartículas com OC												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C				NPP		NPP		NPP				
D				NPA3		NPA3		NPA3				
E				NPA5		NPA5		NPA5				
F				NPF		NPF		NPF				
G												
H												
Triplicata 1				Triplicata 2				Triplicata 3				
Placa D – Placa Controle com OC												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				CA3		CA3		CA3				
C				CA5		CA5		CA5				
D				CF		CF		CF				
E				CM		CM		CM				
F				CP		CP		CP				
G												
H												
Triplicata 1				Triplicata 2				Triplicata 3				

Figura 27. Esquema da distribuição das soluções e controles no bioensaio de viabilidade celular em placas de 96 poços.

Sendo assim, as formas promastigotas, obtidas do cultivo em fase final logarítmica foram colocadas, conforme o delineamento descrito, nas placas de 96 poços, à 24°C, onde após 30 minutos, com ou sem a presença do OC, a temperatura e pH foram mensurados. É importante salientar que os parâmetros de utilização do OC seguiram os definidos pelos ensaios de hipertermia no respectivo aparelho, em que o equipamento utilizado foi da marca

CARCI e modelo Diatermed II. O tempo de tratamento com ondas curtas foi de 30 minutos, com tuning (sincronia) de 100%, modo contínuo e intensidade máxima para todos os ensaios. Nas avaliações sem o OC foi seguido o mesmo parâmetro temporal (30 minutos de relação com as substâncias e o meio parasitário).

Para melhor avaliação da temperatura foram utilizados quatro termômetros nas placas com NP's e cinco nas placas controles, onde os mesmos foram inseridos nos poços logo após o término dos 30 minutos e, no caso do OC, após o término de sua aplicação. Foram utilizados, para tanto, termômetros de ponteira de líquidos da marca INCOTERM, os quais foram inseridos simultaneamente em todos os poços de uma coluna, sendo o tempo de mensuração de cada coluna de 8 segundos. O termômetro designado para um mesmo tipo de substância, seguindo a linha nos poços, nunca era utilizado em outro, garantindo assim a não contaminação inter ou intra placas e a medição correta da temperatura em todos os poços, já que o tempo de mensuração foi mínimo (24 segundos total — 3x8segundos).

A mensuração do pH era realizado logo após a obtenção da temperatura, mediante utilização do Indicador de pH Universal de papel, da marca MACHEREY-NAGEL, ranger 1-11 pH.

Por fim, foram formadas mais quatro placas de 96 poços, com as mesmas conformações e mapeamento das placas originais (utilizadas no delineamento experimental), em que 10µl de cada poço retirado foi adicionado 80µl de meio RPMI e 10µl de solução de azul de Tripán (Sigma, 0,4%), visando a contagem de parasitos em hemocitômetro (Sigma), com a finalidade de validação pela verificação das formas sobreviventes à ação das substância e aos métodos. Os resultados foram apresentados na forma de parasitas vivos e mortos em cada poço das placas avaliadas e, conseqüentemente, cada substância, controle ou repetição. Todos os processos do bioensaio foram realizados no Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, do INPA, sob a coordenação da Dra. Antônia Maria Ramos Franco Pereira.

4.3.2. Análise dos Dados do Bioensaio

A análise estatística foi feita utilizando a linguagem de programação R (R CORE TEAM, 2016). Foi realizada a Análise de Variância por duas vias (ANOVA TWO WAY) para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem OC e as diferentes substâncias utilizadas. Foi considerado o nível de significância de 0,05. Para a comparação de médias dos tratamentos, foi realizado o teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa deste capítulo aborda as caracterizações estruturais, morfológicas e magnéticas das NP's produzidas por método de coprecipitação, contendo também as justificativas para as escolhas consideradas mais adequadas em relação ao prosseguimento metodológico. Serão apresentados, ainda, resultados relacionados aos testes de hipertermia magnética com e sem o uso do ondas-curtas. Por fim, os dados referentes ao bioensaio de atividade leishmanicida, *in vitro*, serão apresentados e discutidos.

5.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS- Zetasizer)

As medidas de Dispersão Dinâmica de Luz foram realizadas visando a mensuração do tamanho de partícula e, nesse caso, a análise do tamanho médio das NP's serviu de base para a seleção das soluções mais aptas ao prosseguimento metodológico; já que diversas concentrações de ligantes (ácido glicurônico e frutose) foram utilizados como revestimentos a partir da solução precursora. Assim, as NP's que apresentaram um diâmetro médio muito acima do valor limítrofe para o espectro nano (100nm) foram imediatamente excluídas das análises subseqüentes.

As figuras 28, 29 e 30 revelam, respectivamente, os gráficos de intensidade versus tamanho de partículas, para a solução precursora e para as nanopartículas revestidas, de acordo com o ligante utilizado e a concentração. As figuras 28 e 29 agrupam as imagens em duas unidades: Grupo do Ácido Glicurônico (NPA3; NPA5 e NPA10) e Grupo da Frutose (NPF3; NPF5 e NPF10).

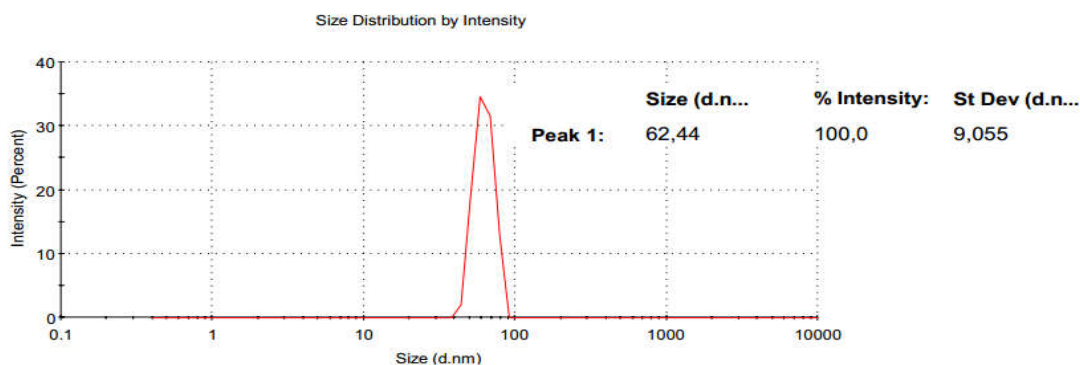


Figura 28. DLS da NPP (solução “precursora”) de NPOF.

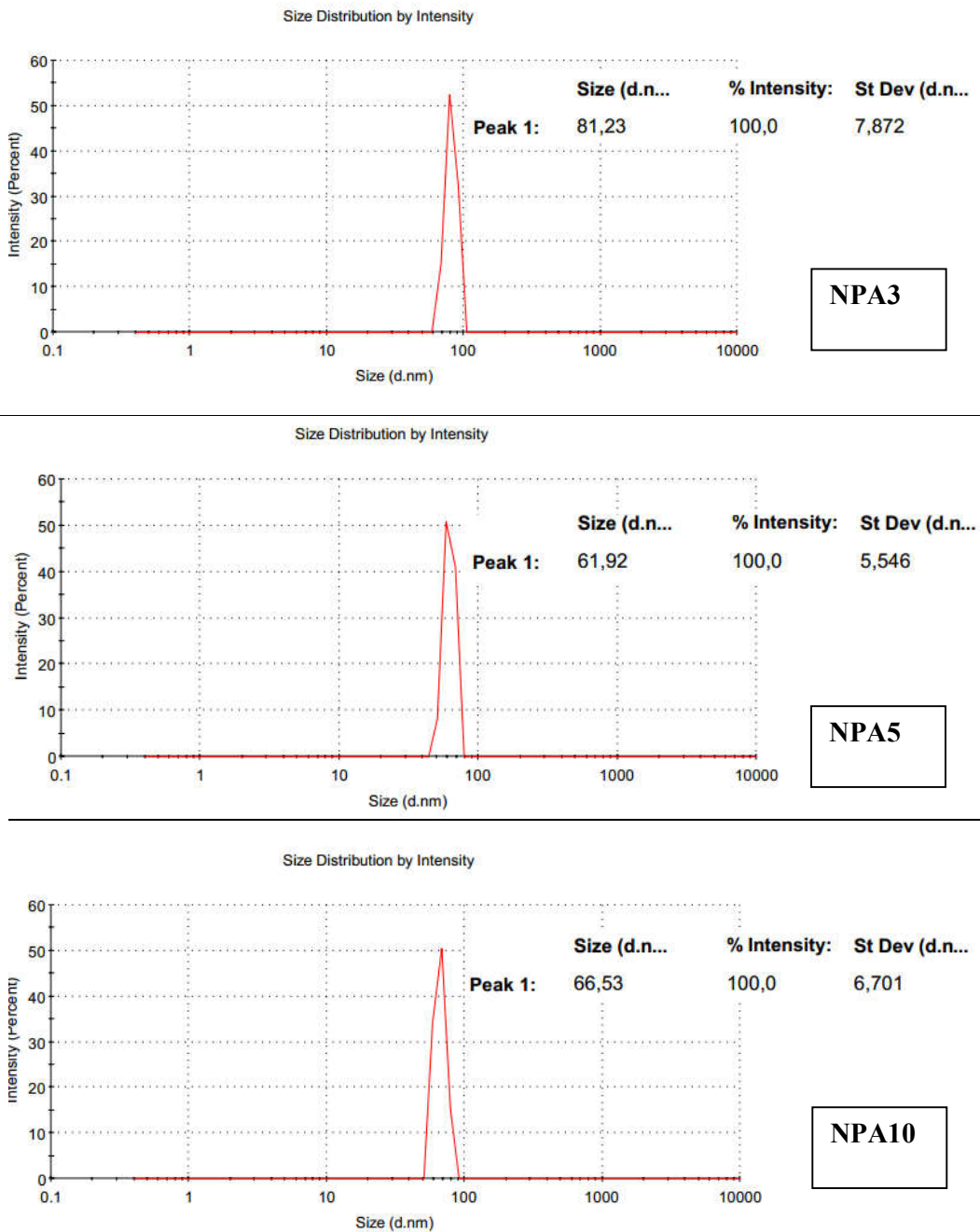
Grupo do Ácido Glicurônico – Nanopartículas revestidas com Ácido

Figura 29. Gráficos de intensidade versus tamanho de partículas, para as soluções de nanopartículas revestidas com ácido glicurônico.

Grupo da Frutose – Nanopartículas revestidas com Frutose

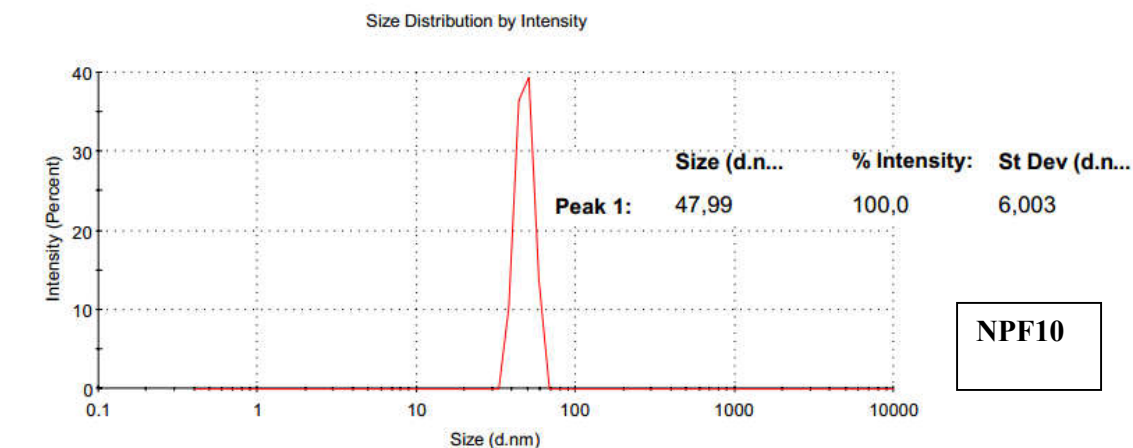
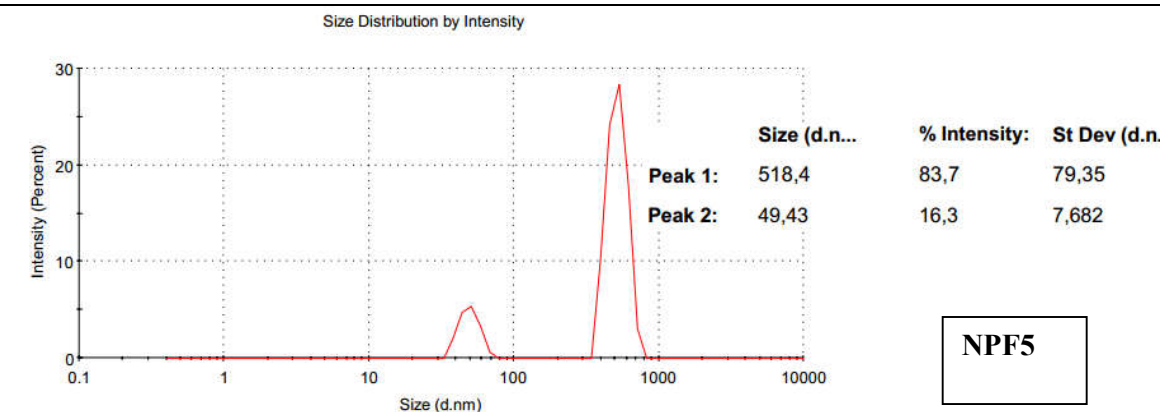
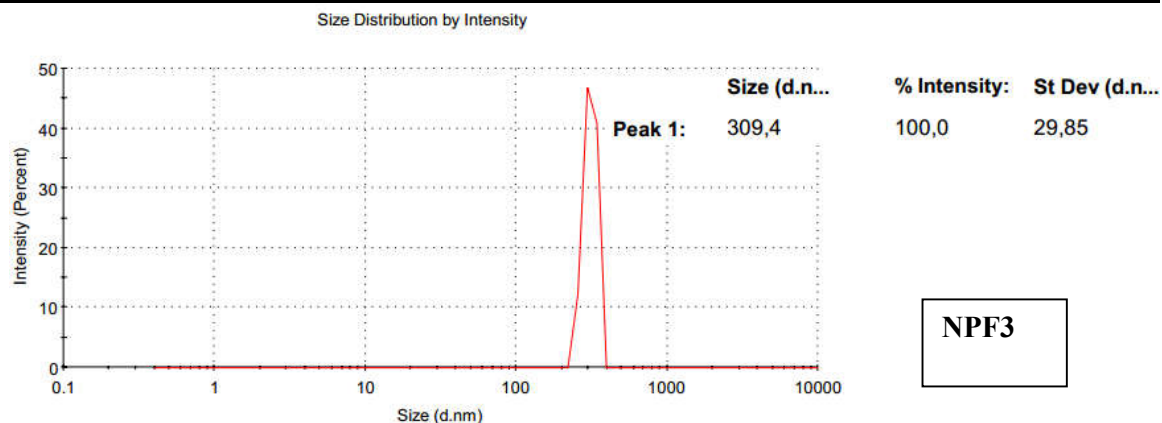


Figura 30. Gráficos de intensidade versus tamanho de partículas, para as soluções de nanopartículas revestidas com ácido glicurônico.

Conforme Figura 28, o tamanho de partícula para a solução precursora (NPP) ficou dentro do limite do espectro “nano” (aproximadamente 62,44 nm), o que viabilizou o

prosseguimento para as demais fases de caracterização. Contudo, como o processo do DLS baseia-se em uma estimativa do tamanho da partícula, adotando uma média aproximada, é possível que a mesma esteja super ou subestimada, sendo necessária a realização de microscopias que confirmem ou elucidem mais fidedignamente o real tamanho de partícula. Entretanto, a ferramenta do DLS pode, facilmente, ser empregada para uma avaliação geral do tamanho das partículas, já que trata-se de um método rápido, que pode ser realizado em meio aquoso, de baixo custo e relativa confiabilidade.

Nesse sentido, todas as amostras revestidas com ácido, nas diferentes concentrações, podem ser consideradas nanopartículas, todavia, como a estimativa do tamanho das mesmas pode ser considerada próxima (82,23; 61,92 e 66,53 nm), optou-se por manter em prosseguimento metodológico somente as duas amostras que continham maior percentual de ácido (NPA3 e NPA5), já que algumas das caracterizações subsequentes irão justamente avaliar a interação do ligante com as nanopartículas e, nesse caso, quanto maior a concentração do revestimento, provavelmente, maior será o efeito observado.

Já nas amostras revestidas com frutose, o DLS indicou alterações robustas no tamanho de partícula das amostras NPF3 e NPF5, mesmo quando levado em consideração o desvio-padrão. Tal achado pode estar relacionado à facilitação de precipitação e aglomeração das NP's devido o alto peso e volume molecular desse açúcar. Além disso, há a possibilidade que o DLS tenha identificado clusters nas amostras revestidas com frutose, o que mascararia o tamanho indicado. Contudo, como a utilização do DLS foi para aplicação seletiva, optou-se por manter em análise apenas as amostras com estimativas de tamanho de partícula dentro do ranger “nano” ou próxima a este, o que foi excludente para as amostras com maior concentração de frutose.

Assim, prosseguiram para as demais etapas metodológicas apenas a amostra precursora (NPP) e as revestidas: NPA3; NPA5 e NPF10; gerando um total de quatro amostras selecionadas.

5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura por Canhão de Emissão de Elétrons (MEV-FEG)

As quatro soluções selecionadas, no DLS, prosseguiram para análise em MEV-FEG, o qual, juntamente com outras técnicas de microscopias eletrônicas, é uma ferramenta importante para investigação da morfologia superficial, estrutura de poros dos materiais

sólidos e definição mais fidedigna do tamanho de partículas, em casos de materiais particulados.

As figuras 31, 32 e 33 apresentam as imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura por Canhão de Emissão de Elétrons para a solução precursora de nanopartículas (NPP) e para as soluções revestidas com ácido glicurônico (NPA3 e NPA5) e frutose (NPF10). Em todas as imagens, foi possível observar uma morfologia esférica regular, relativamente homogênea entre as partículas com diâmetro médio variando em torno de 60 nm. A morfologia esférica ou pseudo-esférica também foi encontrada nos trabalhos de SILVA *et al.*, 2011, SHU e WANG, 2009 e COSTA, 2013. Vale salientar que as imagens apresentadas neste trabalho foram selecionadas entre as várias obtidas para cada amostra, sendo estas escolhidas por serem as mais representativas do conjunto de imagens coletadas.

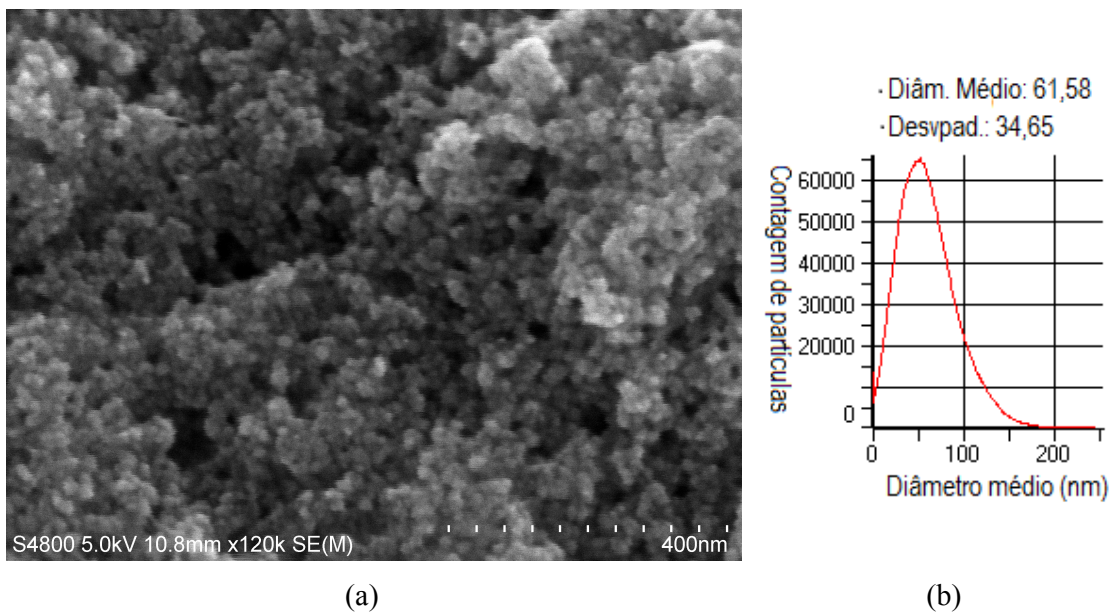
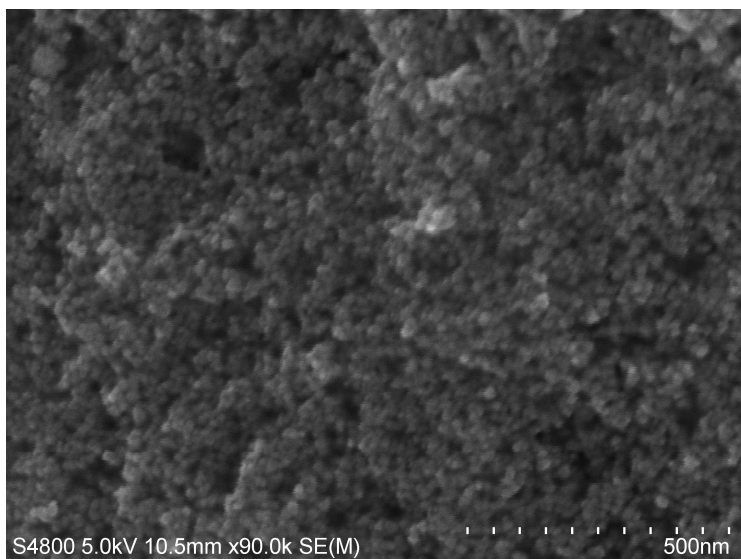
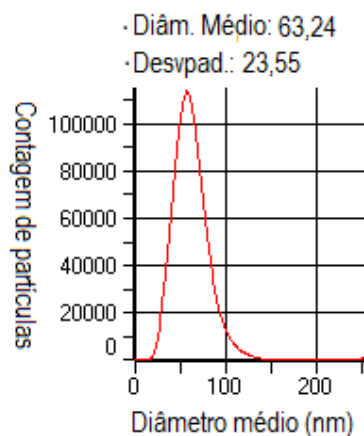


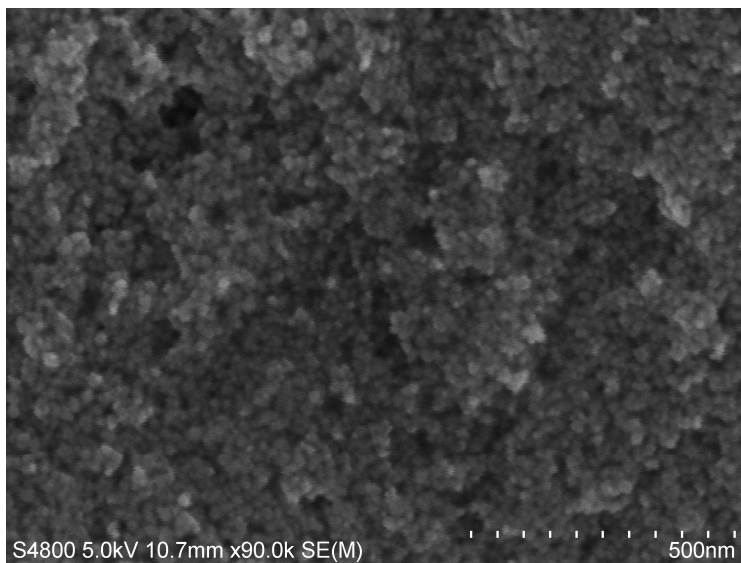
Figura 31. (a): Imagem do MEV-FEG da solução precursora (NPP). (b): Histograma gerado pelo software ImageProPlus apresentando o diâmetro médio de partícula de 61, 58nm.



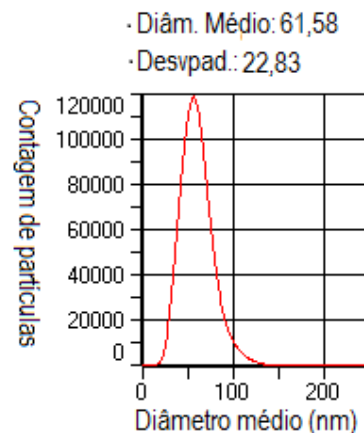
(a)-NPA3



(b)-NPA3



(c)-NPA5



(d)-NPA5

Figura 32. Imagens do MEV-FEG referentes as solução de nanopartículas revestidas com Ac. Glicurônico. (a)-NPA3: Imagem do MEV-FEG da solução de nanopartículas revestidas com Ac. Glicurônico na proporção 1:3 (NPA3); (b) -NPA3: Histograma gerado pelo software ImageProPlus da amostra NPA3, apresentando o diâmetro médio de partícula de 63, 24 nm; (c)-NPA5: Imagem do MEV-FEG da solução de nanopartículas revestidas com Ac. Glicurônico na proporção 1:5 (NPA5); (d) -NPA5: Histograma gerado pelo software ImageProPlus da amostra NPA5, apresentando o diâmetro médio de partícula de 61, 58 nm.

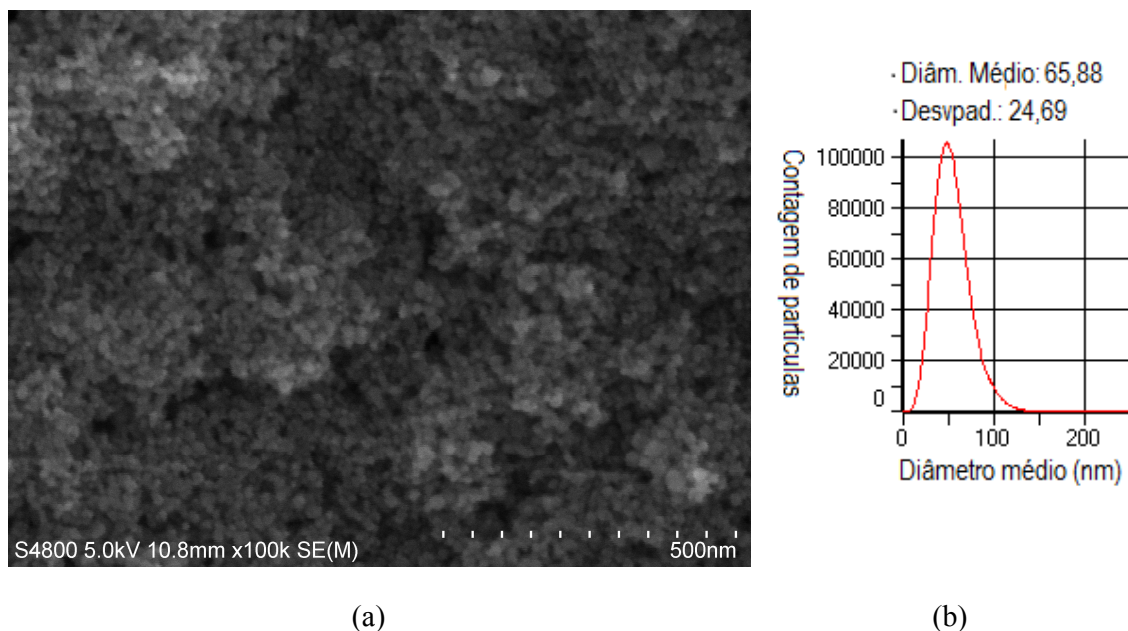


Figura 33. (a): Imagem do MEV-FEG da solução de nanopartículas revestida com frutose (NPF10). (b): Histograma gerado pelo software ImageProPlus apresentando o diâmetro médio de partícula de 65, 88 nm.

Histogramas de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro), obtidos por meio do software ImageProPlus, estão presentes em cada imagem selecionada e corroboram com os resultados encontrados pelo DLS (*Zetasizer*), sobretudo quando analisa-se o desvio-padrão para o diâmetro médio. Assim, é possível observar que a introdução dos ligantes selecionados não alterou significativamente o diâmetro médio das nanopartículas, nem tampouco modificou a morfologia das mesmas. É importante salientar, contudo, que o histograma e o diâmetro médio gerado pelo software são obtidos por uma série de variáveis espaciais e de intensidade de coloração de cinza, as quais permitem a predição do histograma e diâmetro com desvio-padrão, o que permite uma medida mais correta que a gerada pelo DLS, mas não fixa do valor exato.

5.3. Espectroscopia de Mössbauer

Como as fases do óxido de ferro de magnetita e maghemita são fases concorrentes para a identificação nas análises de difração de raio-X (DR-X), optou-se por apresentar primeiramente os resultados da Espectroscopia de Mössbauer, a qual esclarece o estado de

oxidação do ferro, permitindo concluir, entre outros aspectos, quais as fases predominantes do óxido de ferro e suas proporções relativas na amostra.

Desse modo, os espectros de Mössbauer, à temperatura ambiente, são apresentados na Figura 34 e os parâmetros hiperfinos na tabela 6.

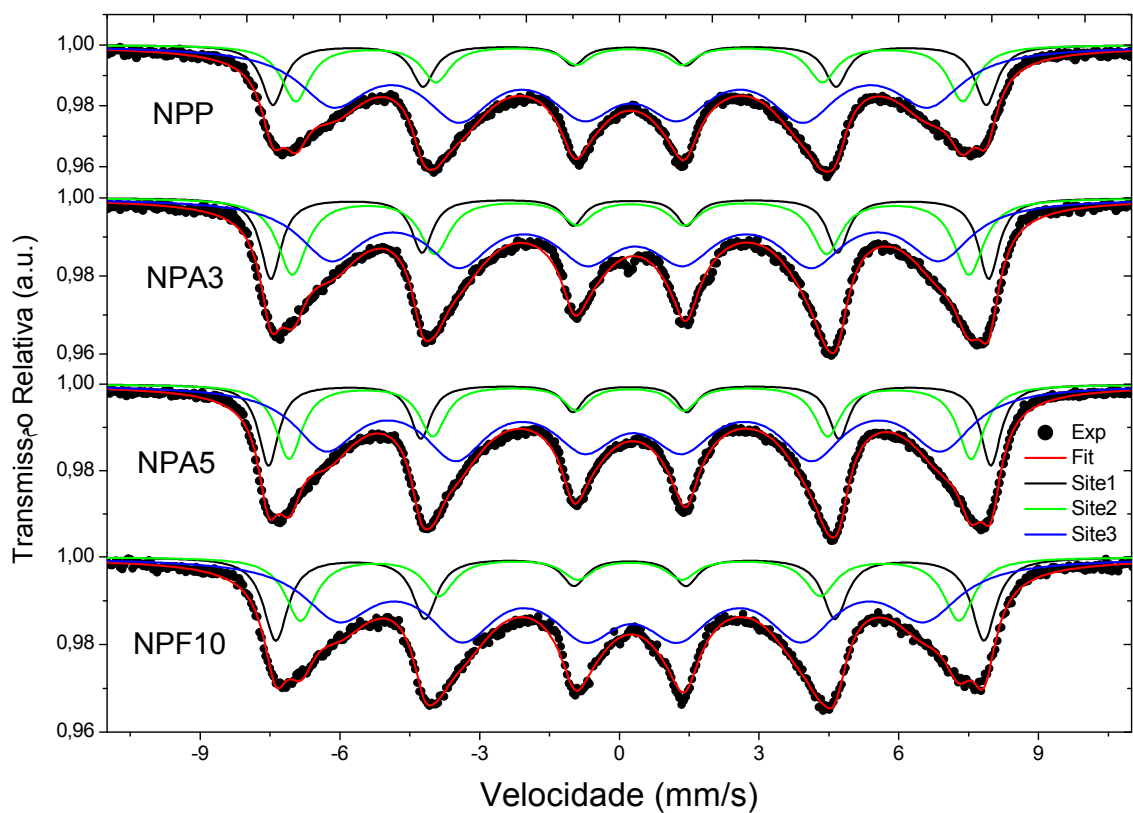


Figura 34. Espectroscopia de Mössbauer para as amostras NPP; NPA3, NPA5 e NPF10.

É importante lembrar que na espectroscopia os desvios isoméricos referem-se sempre ao Fe natural e, neste trabalho, os pontos indicam os dados experimentais, a linha contínua (em vermelho), o ajuste, e as demais linhas (coloridas) referem-se aos subspectros associados às fases e/ou sítios cristalinos presentes nos materiais.

Tabela 6. Parâmetros hiperfinos dos espectros de Mössbauer medidos em 300 K.

	Site 1			Site 2			Site 3		
	DI (mm/s)	Bhf (T)	Área %	DI (mm/s)	Bhf (T)	Área %	DI (mm/s)	Bhf (T)	Área %
NPP	0,33	47,5	15	0,32	44,4	18	0,38	39,6	67
NPA3	0,33	47,8	18	0,35	45,1	25	0,42	40,5	57
NPA5	0,34	48,1	18	0,34	45,4	21	0,41	40,9	61
NPF10	0,33	47,1	20	0,33	43,8	18	0,38	39,1	62

OBS: DI: deslocamento isomérico; Bhf: campo magnético hiperfino; Área: área relativa.

Para entender melhor a identificação do estado de oxidação do ferro, dentro de uma amostra com diferentes fases cristalinas do óxido de ferro, faz necessário compreender o comportamento do campo hiperfino do ferro em cada estrutura, permitindo com isso a comparação e conseqüentemente identificação das fases. Nesse caso, é conhecido que para magnetita, o campo hiperfino magnético do Fe em sítios octaedrais é maior que o campo magnético do Fe em sítios tetraedrais. Para a magnetita estequiométrica a área relativa do sítio octaedral é duas vezes maior que a área relativa do sítio tetraedral. Os sítios octaedrais são ocupados por quantidades iguais de cátions de Fe divalente e trivalente. O deslocamento isomérico (DI) do sítio tetraedral é duas vezes maior que o DI do sítio octaedral (SERNA e MORALES, 2013).

No ajuste proposto neste trabalho, os três subespectros chamados de Site 1, Site 2 e Site 3 correspondem adequadamente à íons de Fe na estrutura correspondente aos óxidos de ferro. Os valores de DI são compatíveis com o deslocamento isomérico do Fe³⁺. Os site 1 e 2 correspondem a cátions de Fe localizados em estruturas octaedrais e tetraedrais, respectivamente.

A área relativa desses subespectros é um indicativo da quantidade de cátions de Fe que ocupam esses sítios. Observa-se que as áreas relativas dos subespectros site 1 e site 2 são próximas, o que indica que o óxido examinado é de maghemita e não magnetita, já que neste último a área relativa seria maior, sobretudo quando em comparação com o site 1 e 2.

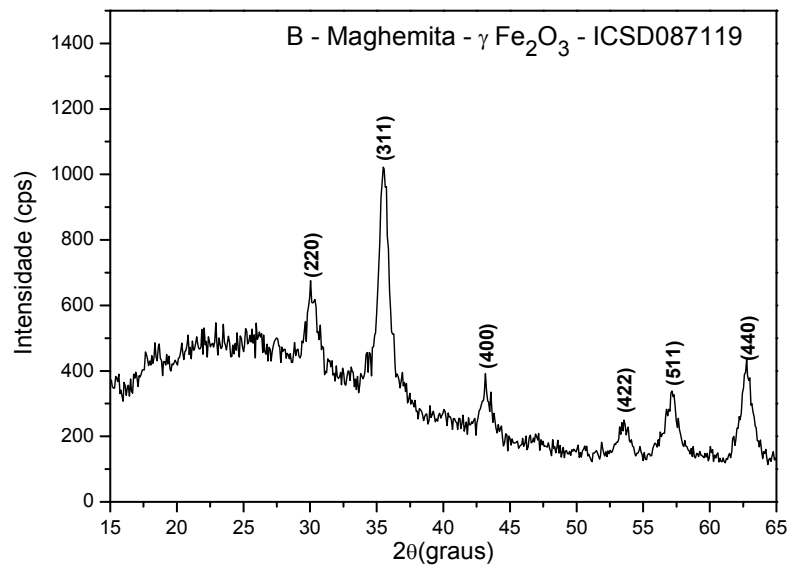
O subespectro do site 3 apresenta largura de pico maior que os outros dois subespectros, e o campo magnético é menor que os outros dois sites. Os picos centrais têm intensidade maior que os picos laterais, todas estas são características de partículas que apresentam relaxação magnética rápida. Assim, o subespectro do site 3 corresponde a partículas de maghemita com o menor diâmetro, já os outros subespectros estão relacionados a partículas com diâmetro maior e têm relaxação muito lenta. Na temperatura de análise,

300 K (26,85 °C), as partículas maiores estão bloqueadas magneticamente e as menores estão próximas do regime superparamagnético.

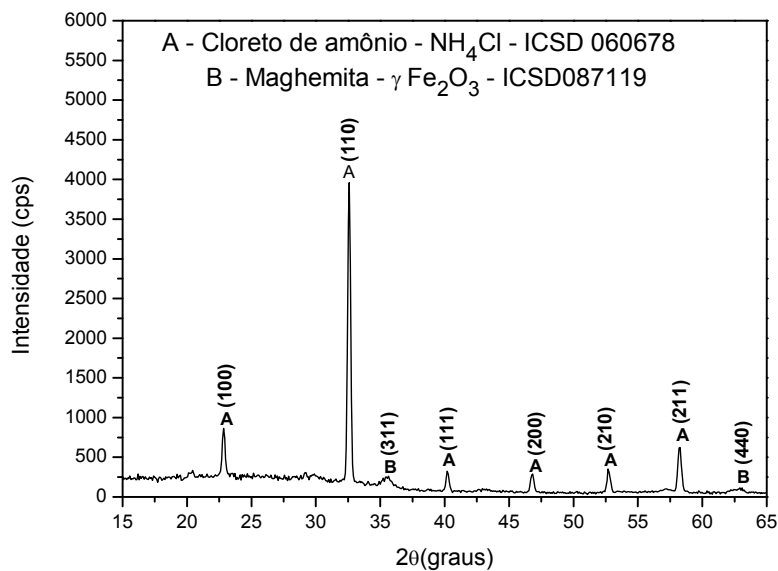
5.4. Difração de Raio-X

A difração de Raio-X foi executada no sentido de identificação das fases cristalinas presentes nas amostras, assim como, certificar que os resultados observados na espectroscopia de Mössbauer apresentaram assertividade, já que nessa última técnica foi encontrado a presença de maghemita pura, sem apresentação de demais óxidos de ferro, sobretudo a magnetita, a qual é uma fase concorrente para os difratogramas em óxidos de ferro; visto que ambos os materiais são muito semelhantes na estrutura cristalina (CFC - tipo espinélica) e propriedades magnéticas, o que dificulta a diferenciação.

Nesse contexto, as Figuras 35 e 36 apresentam padrões de difração de raios X que indicam, em todas as amostras, a presença da fase cúbica de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sendo as reflexões atribuídas a (220), (311), (400), (422), (511) e (440), conforme os planos cristalográficos, que são as reflexões características da maghemita, segundo a carta JCPDS-ICSD 087119 e corroborando com os estudos atuais (ALI, SARFRAZ, *et al.*, 2015; MIRZA, ALI, *et al.*, 2015; PAMAR, SMOLKOVA, *et al.*, 2015).

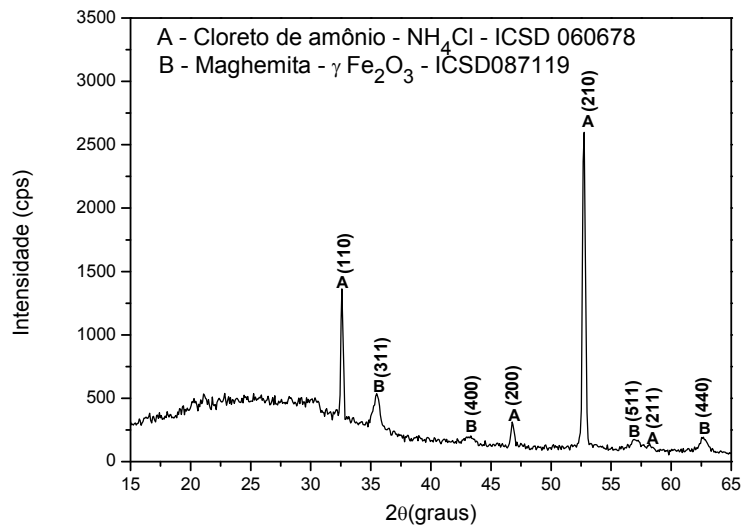


(a) – NPP
lavada

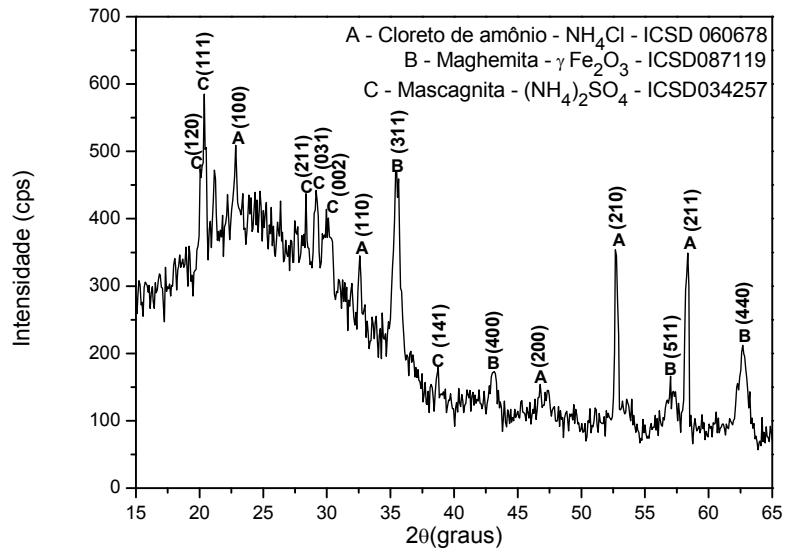


(b) – NPP
não lavada

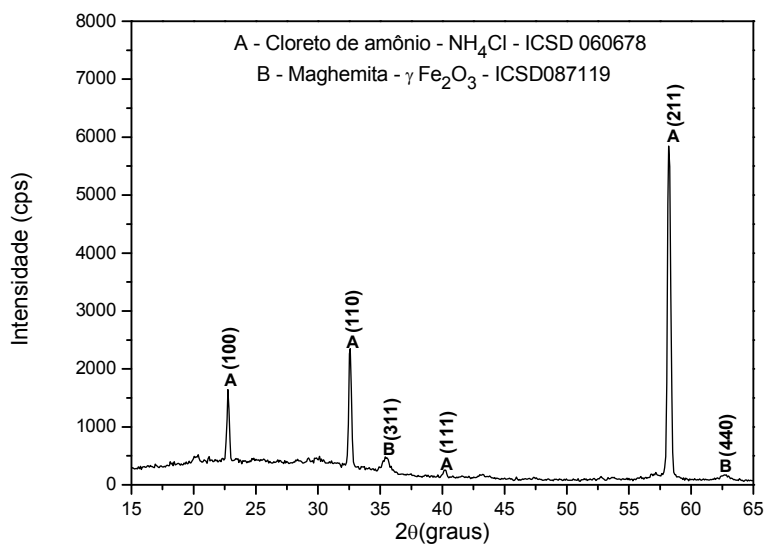
Figura 35. Difratoograma de Raio-X da amostra NPP lavada (a) e não lavada (b).



(c) – NPA3



(d) – NPA5



(e) – NPF10

Figura 36. Difratoograma de Raio-X das amostras: NPA3 (c); NPA5 (d) e NPF10 (e).

A Figura 35 revela os picos cristalográficos da mesma amostra, a NPP, isto é, a amostra precursora lavada (a) e a não lavada (b). Esse processo de lavagem e centrifugação, conforme descrito na metodologia, promove a retirada das substâncias indesejadas, como cloretos. Nesse caso, é possível observar que nos difratogramas sem a lavagem há a presença de um produto residual de síntese, o qual é o cloreto de amônio (NH_4Cl); já no difratograma da amostra lavada não foi identificadas impurezas, sendo possível observar a fase da maghemita pura e sem interferência dos planos de reflexão do cloreto, o que permitiu a identificação dos planos, referentes a maghemita, com maior intensidade.

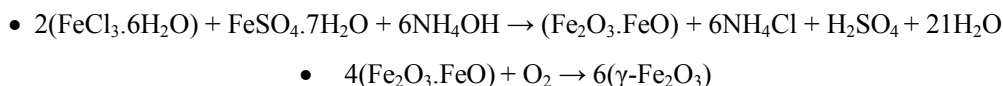
Diante do exposto, foi possível corroborar os resultados obtidos pela espectroscopia de Mössbauer, confirmando que o óxido presente é de fato a maghemita, não havendo a presença de fases dúbias e certificando que a síntese proposta pelo trabalho alcançou os objetivos propostos, já que foi confirmada a obtenção desejada do óxido férrico (“na fase gama- γ ”).

Assim, obteve-se a formação de um óxido mais estável e não suscetível a oxidação espontânea à baixas temperaturas, já que, em muitos casos, a maghemita é o produto principal da oxidação da magnetita e, nessa situação, sua utilização não promoveria a formação de subprodutos indesejados em condições normais de temperatura e pressão, especialmente para aplicações biomédicas, nas quais substâncias indesejadas podem ser tóxicas e atuar negativamente para a efetividade das nanopartículas, como no caso do referido trabalho, que

visa aplicação da maghemita para obter hipertermia e conseqüente efeito leishmanicida (SERNA e MORALES, 2013).

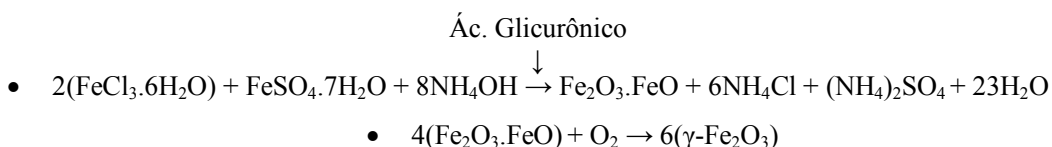
Além disso, a maghemita é um material extremamente versátil, uma vez que é possível sua obtenção como partículas de diferentes morfologias, desde esferas até elipsóides, com ampla gama de tamanhos (entre 2 e 1000nm) e que apresenta diferentes formas de aplicações, envolvendo-se em processo de armazenamento de informações, refrigeração magnética, ferrofluidos, sensores magnéticos etc (SERNA e MORALES, 2013).

Em todos os difratogramas a linha de base apresentou irregularidades (ruídos), os quais provavelmente estão envolvidos com a metodologia de execução da difração de raio-X, que foi desenvolvida com a utilização de placas de sílica e, nesse caso, sua reflexão e difração, no momento da análise, levou à formação desses “ruídos”. Outra explicação seria a presença de fase amorfa, a qual está relacionada com a presença de umidade (H₂O) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), gerado pela adição do sulfato de ferro com cloreto de ferro III, em presença do hidróxido de amônio, segundo o modelo químico teórico abaixo:



Esse modelo e, conseqüentemente, a identificação de seus produtos nas soluções avaliadas, foram confirmados pelos difratogramas das amostras NPP; NPA3 e NPF10, indicando também que a introdução dos ligantes nas nanopartículas de maghemita não levou a formação de uma nova fase cristalina. Desse modo, o processo de revestimento das nanopartículas provavelmente está relacionado com a adsorção dos ligantes por meio físico ou por ligações químicas fracas, as quais deverão ser elucidadas pelas análises de FTIR e conseqüente identificação de grupos funcionais.

Na amostra NPA5, Figura 36 (d), foi identificada uma nova fase cristalina, a mascagnita ((NH₄)₂SO₄), condizente com a carta JCPDS-ICSD034257. O que indica que a introdução reduzida do ácido glicurônico, com sutil alteração de equilíbrio e pH, provavelmente levou à formação da mascagnita, segundo o modelo químico teórico abaixo:



É importante salientar ainda que devido a orientação preferencial e a forma de cristalinização das fases nas amostras (textura cristalográfica), alguns picos de iguais fases se apresentaram mais intensos que outros quando comparamos as amostras, o que não está relacionado com a quantidade de fase presente na amostra, mas sim ao modo como os planos de reflexão estavam orientados no momento da incidência do feixe de raio-X e a forma como a cristalização interferiu na reflexão desse feixe, fornecendo algumas preferências cristalográficas em detrimento à outras. (CALLISTER JR. e RETHWISCH, 2014; ALI, SARFRAZ, *et al.*, 2015).

5.5. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho foi usada para estudar a interação das nanopartículas de maghemita com os ligantes: ácido glicurônico e frutose. Para tanto os espectros de FTIR estão demonstrado nas Figuras 37, 38 e 39.

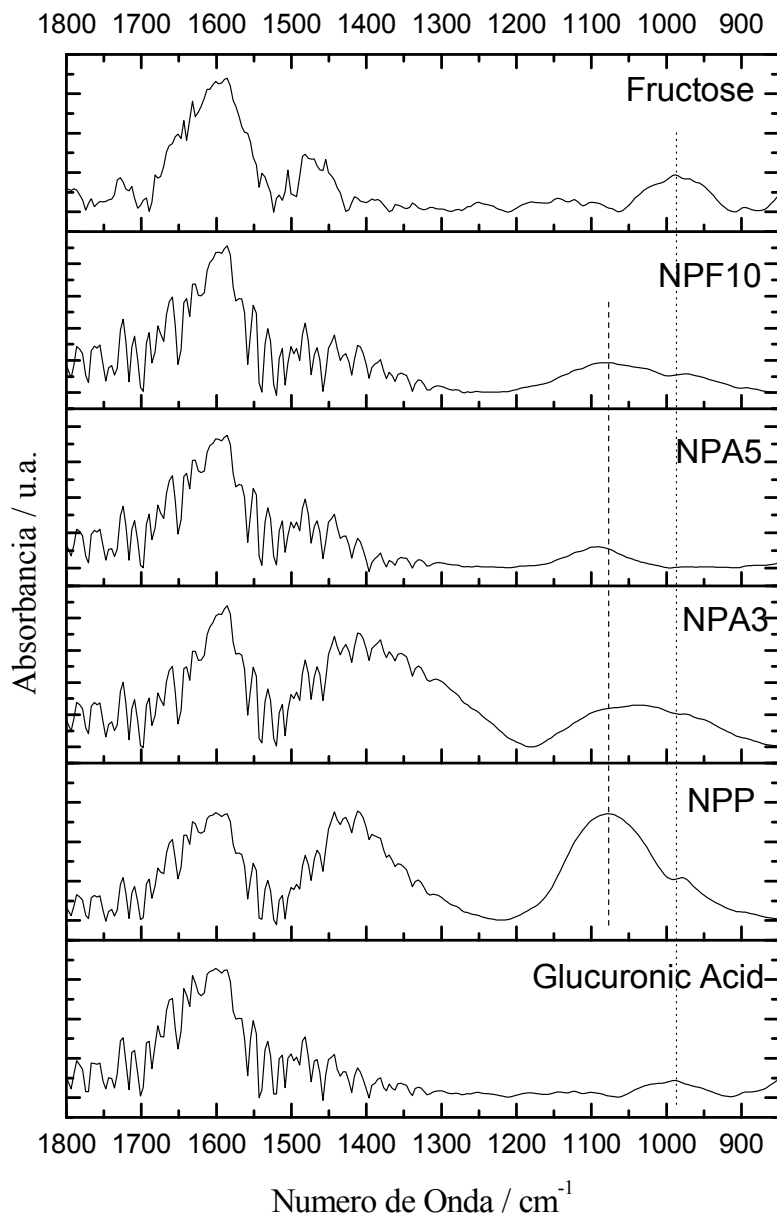


Figura 37. Espectros de Infravermelho das Amostras NPP, NPA3, NPA5 e NPF10, além dos ligantes com a mesma concentração utilizada nas nanopartículas: ácido glicurônico e frutose.

Como evidenciado na Figura 38, a banda próximo a 1080 cm^{-1} se caracteriza, para a solução precursora (NPP), como uma convolução das bandas de NH_4Cl e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. As mesmas características são visualizadas nas amostras contendo ácido e na contendo frutose (NPF10), porém, nessa última, é observado maior deformação da banda, devido à ruídos existentes e

sem a manifestação de picos relativos a frutose (Figura 37); o que permite inferir a não adsorção química da frutose com as nanopartículas de maghemita (SHU e WANG, 2009).

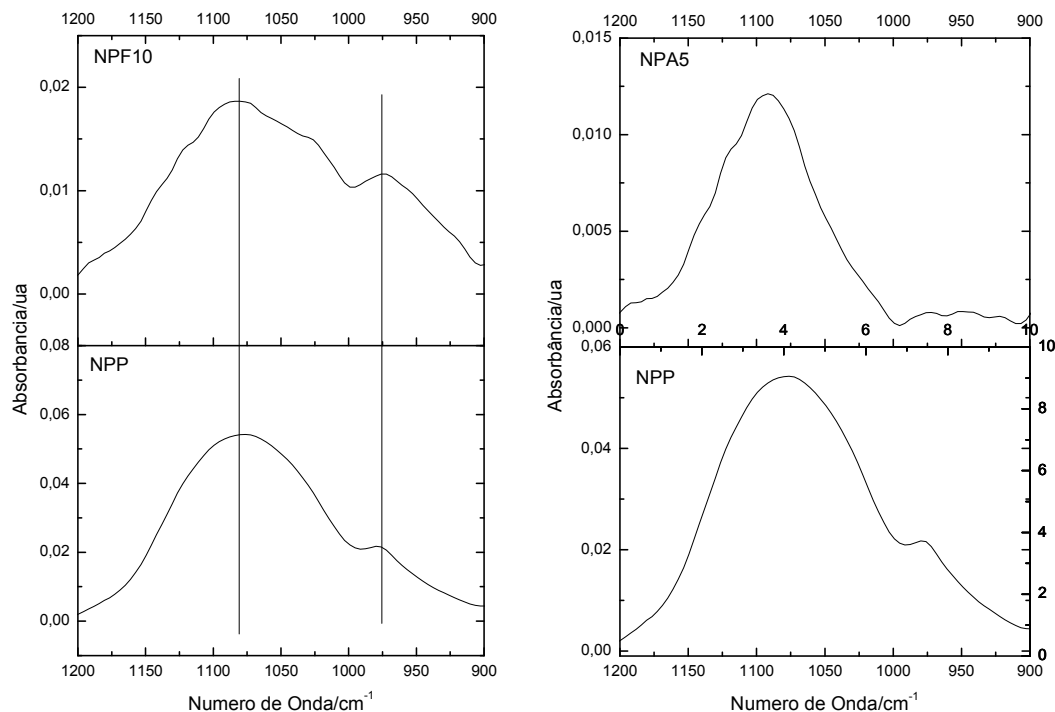


Figura 38. Destaque dos espectros de infravermelho para as amostras NPF10 e NPA5 em comparação com a amostra precursora (NPP), evidenciado a banda próximo a 1080 cm^{-1} , que corresponde à convolução dos picos de NH_4Cl e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Na Figura 38, a amostra NPA3, com maior concentração do ácido, apresenta mais intensamente as características somadas do material NPP e ácido glicurônico isolado, com leves deslocamentos nas bandas de ácido glicurônico, o que pode indicar uma interação entre o composto orgânico e o óxido de ferro; confirmando que houve adsorção do ligante com as nanopartículas de maghemita, em níveis químicos. Tal interação, contudo, não é claramente evidenciada na amostra NPA5, com menor concentração do ligante; o que indica maior probabilidade de interações físicas com as nanopartículas.

Outro fator que reforça o achado da adsorção química do ácido com as nanopartículas de maghemita na amostra NPA3 é a observação de bandas na região entre 1000-900 cm^{-1} , as quais correspondem a regiões de estiramento da ligação $\nu(\text{C-O})$ e $\nu(\text{C-C})$ (COSTA, 2013; TONKOVIC e BILINSKI, 1995).

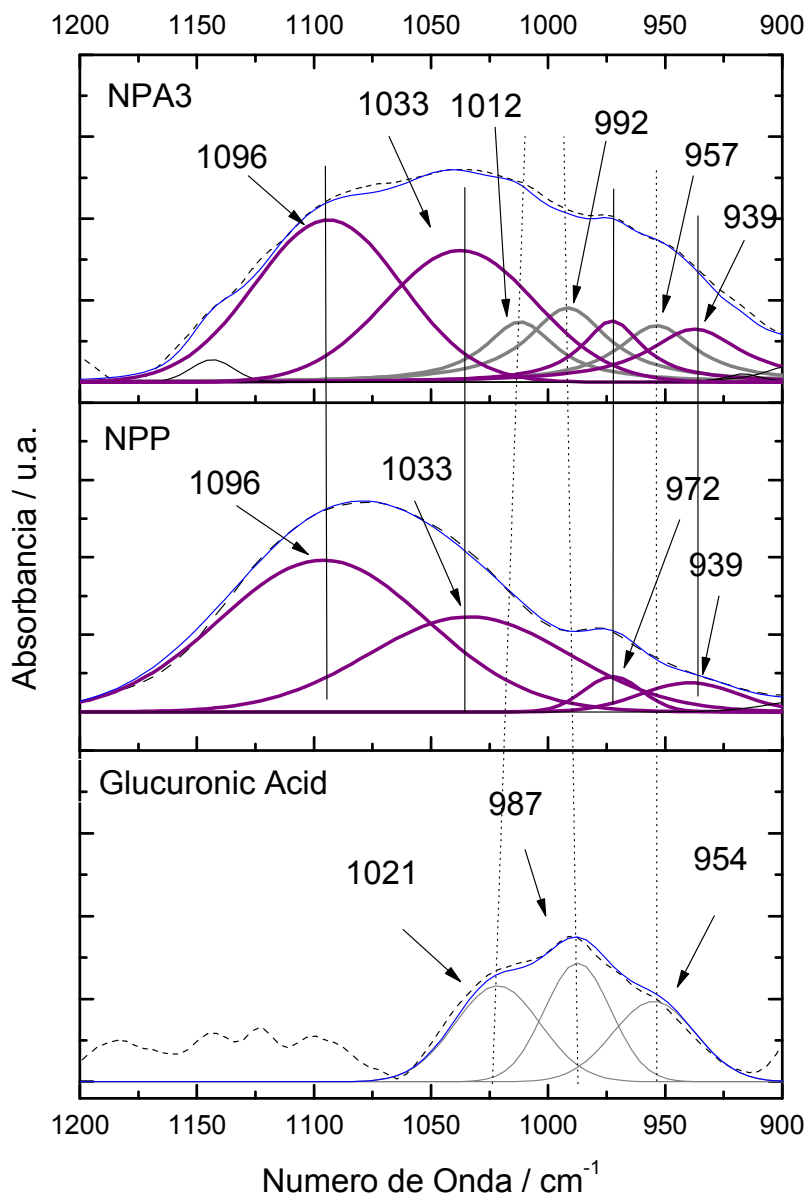
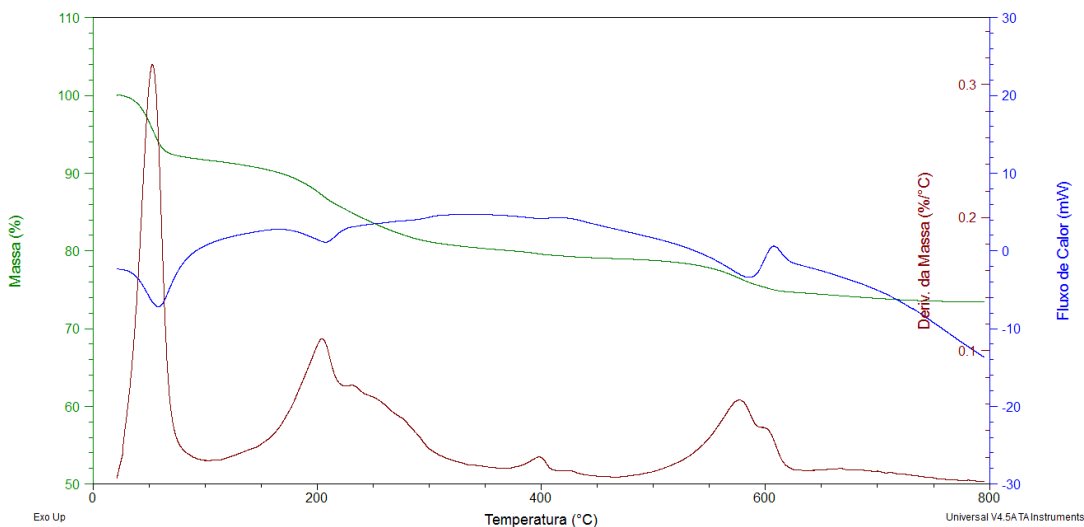


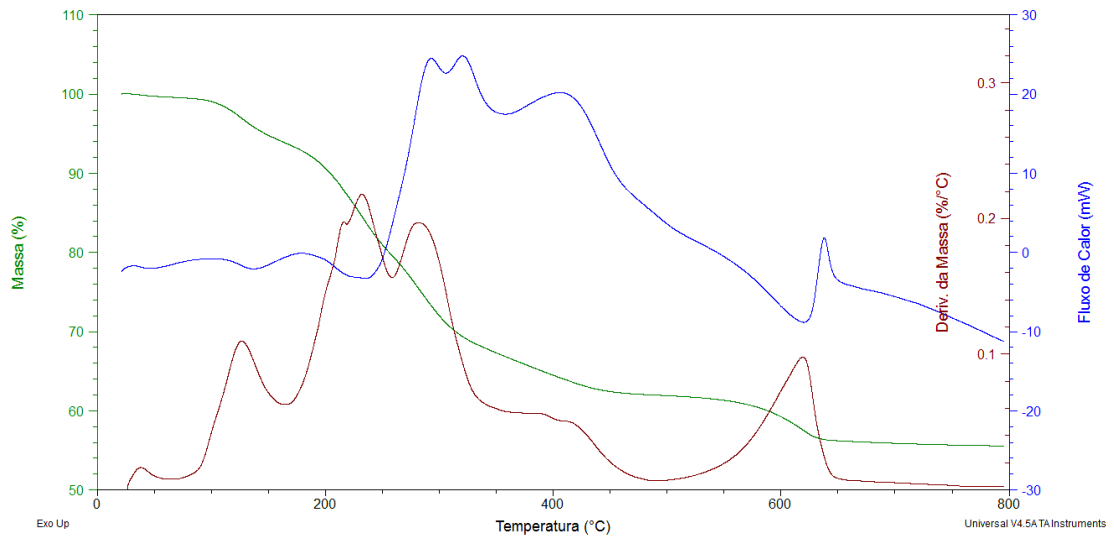
Figura 39. Destaque dos espectros de infravermelho para a amostra NPA3 em comparação com a amostra precursora (NPP) e ácido glicurônico.

5.6. Análises Térmicas (TG/DSC)

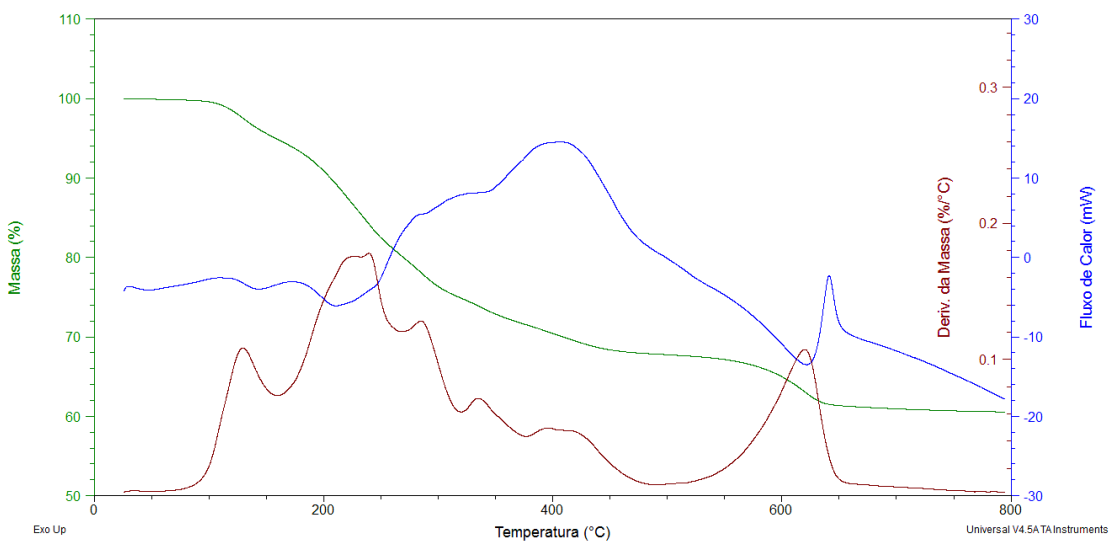
As análises de Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) são mostradas na Figura 40. Na amostra precursora (NPP) [Figura 40-a] pode ser observado perda de massa de 7,9 %, em torno de 53 °C, e 11,28 %, em torno de 204 °C. Essas variações de massa são as dessorções físicas e químicas de água adsorvida pelas nanopartículas, respectivamente. Outros dois decaimentos de massa de 2,09 %, na faixa de temperatura de 398 C, e 4,14 % (entre 504 °C e 632,54 °C), são as decomposições físicas e químicas do cloreto de amônio, respectivamente. Na curva do DSC da Figura 40-a, também, é notado picos endotérmicos correspondentes à perda de massa da água e do cloreto de amônio (58 °C; 207 °C; 400 °C; 586 °C, respectivamente). Um pico exotérmico é observado na temperatura de 608 °C, o qual demonstra o ponto em que a microestrutura de Maghemita (γ -Fe₂O₃) se decompõe formando a microestrutura Hematita (α -Fe₂O₃). A energia dessa transição foi calculada na ordem de 127,08 J/g, correspondente a energia de recristalização e rearranjo dos íons no cristal (DAREZERESHKI, 2011; YE, LIN, *et al.*, 1998).



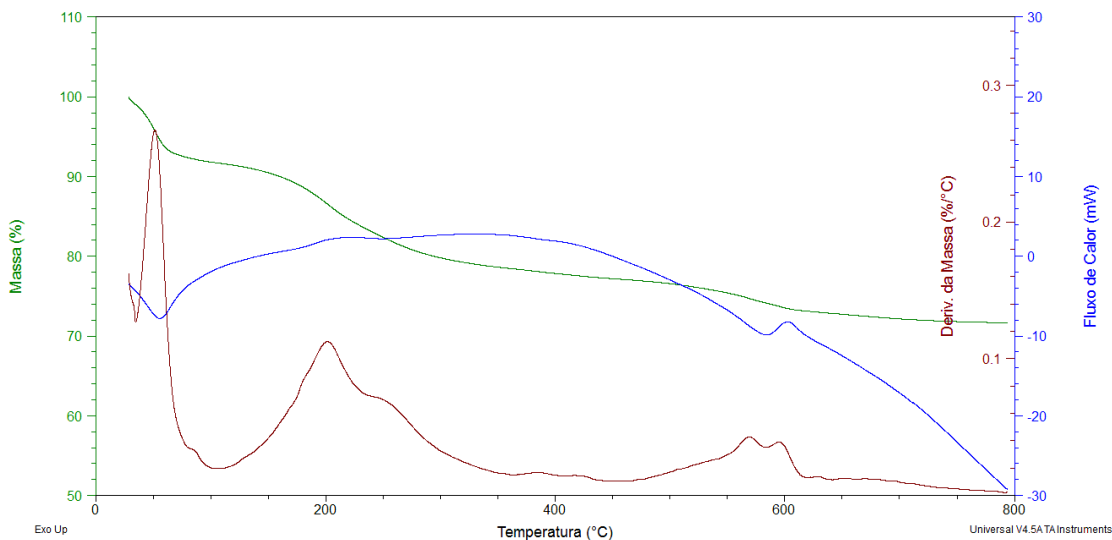
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 40. Gráficos dos resultados referentes às análises térmicas das amostras: (a) NPP; (b) NPA3; (c) NPA5 e (d)NPF10.

Ainda na Figura 40-b, é possível observar a perda de massa de água 6,17 %, aproximadamente, por volta de 128 °C. Já, entre as temperaturas de 170 e 335 °C, ocorre perda de massa de 25,23 %, que está relacionado a evaporação de ácido glicurônico, visto que na amostra NPA3 foi introduzido um percentual maior de ácido com o objetivo de formular uma estrutura micelar, para envolver e proteger as nanopartículas. Nesse caso, com o intuito de melhor distinguir a degradação térmica do ácido glicurônico, foram realizados testes de TGA e DSC no reagente puro (Figura 40).

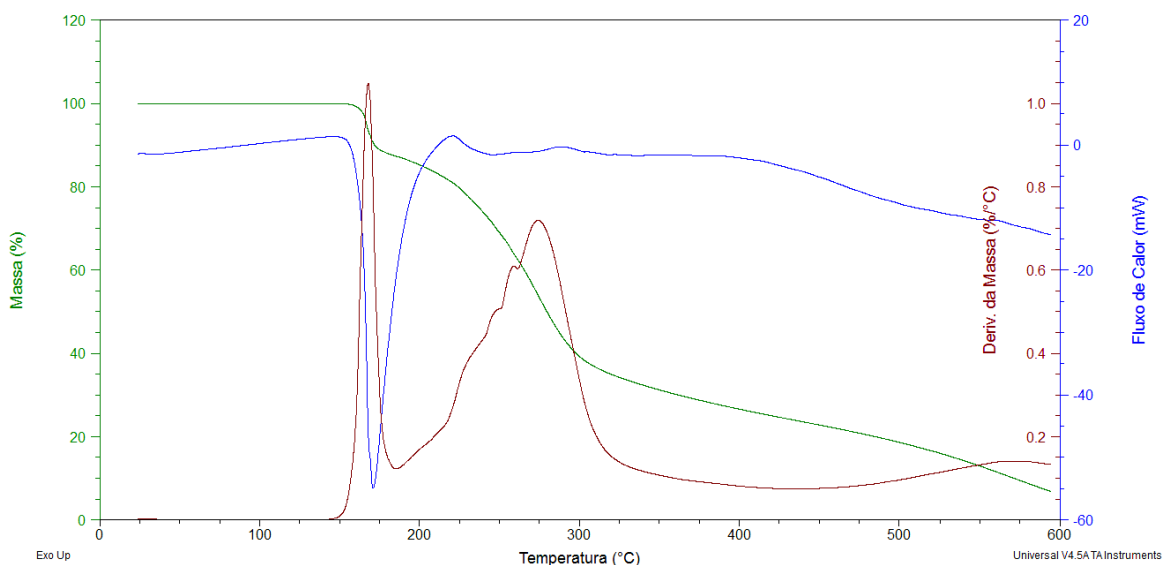


Figura 41. Gráfico da análise térmica do ácido glicurônico P.A.

A amostra NPA5 (Figura 40-c) tem o gráfico da TGA similar com o apresentado pela amostra NPA3 (Figura 40-b), demonstrando perda de massa de: água de 5,19 %, em torno de 129 °C; de ácido glicurônico de 19,97 %, entre 160 °C e 319 °C; e de sulfato de amônio de 7,06 %, entre 319 °C e 487 °C, agora, evidenciado pela menor proporção de ácido do glicurônico (1:5 mmol de Fe) (ARCE, LUNA, *et al.*, 2016).

Na curva do DSC, como a amostra NPA3 possui maior concentração de ácido, foi possível observar uma melhor resolução dos picos endotérmicos de perda de massa das substâncias associadas (água, ácido glicurônico e cloreto de amônio), nas temperaturas de 136, 235 e 358 °C, respectivamente. Em ambas as amostras NPA3 e NPA5 também foram observados os picos exotérmicos da transformação da microestrutura Maghemita em Hematita.

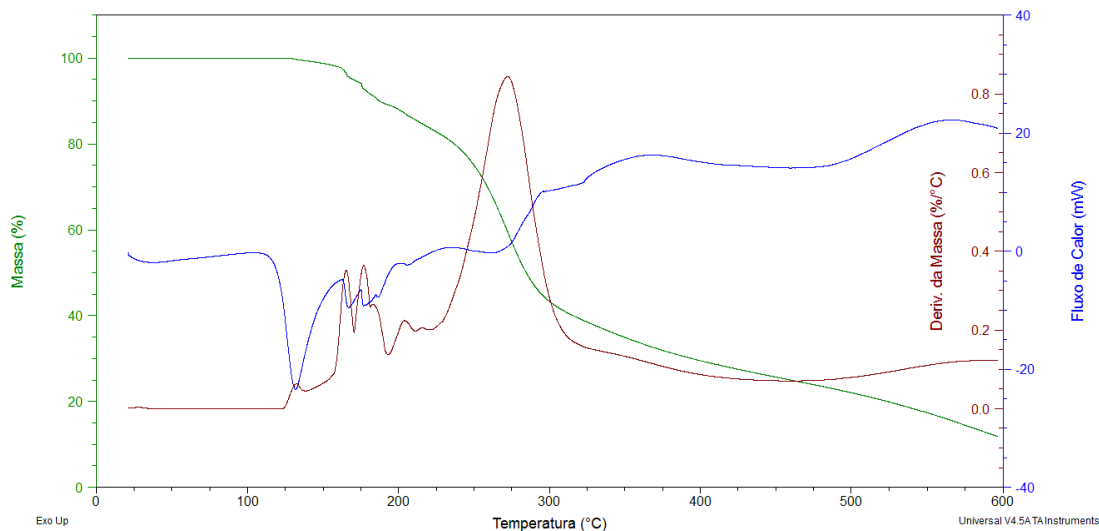


Figura 42. Gráfico da análise térmica da frutose.

Na TGA da amostra NPF10 (Figura 40-d) são observadas três rampas de perda de massa (8,15 %, 13,15 % e 6,21 %), relacionadas a degradação da água, frutose associada a água e cloreto de amônio, nas respectivas temperaturas de pico da derivada de degradação: 51 °C, 201 °C e 559 °C. Tais informações são confirmadas pelos estudos de HARI-BALA *et al.*, 2006 e KUZMENKO *et al.*, 2014, referente as informações do cloreto, e pelo gráfico de análise térmica da frutose, na Figura 42, referente as informações da própria frutose. Foi possível observar também que o comportamento térmico da amostra NPF10 apresentou grande similaridade com o demonstrado pela amostra NPP (Figura 40-a), corroborando com os resultados obtidos pelo FTIR, em que não foi observada adsorção química da frutose às NP's.

Na curva do DSC são destacados dois picos: um pico endotérmico a 55 °C, referente a decomposição da água e um pico exotérmico a 602 °C e entalpia (ΔH) de 33,18 J/g, que pode está relacionado a uma transformação de fase do óxido de ferro em alguma estrutura ferro-carbono, por meio de processos de oxiredução, tendo em vista que ao final da mensuração das análises térmicas (atingindo uma temperatura de 800 °C) foi visualizado resíduos com coloração metálica e completamente diferente das colorações apresentadas pelas demais amostras, as quais demonstraram uma tonalidade marrom-alaranjado, compatível com o processo de degradação de óxidos ferrosos e férricos. Pressupõem-se, desse modo, que átomos de carbono, oriundos da grande cadeia molecular da frutose, difundiram-se para com estruturas de algum óxido de ferro (maghemita ou hematita). Na Figura 43 são apresentadas imagens dos resíduos de cada amostra após o aquecimento no SDT. Vale salientar, entretanto,

que para a determinação exata do processo ocorrido com a amostra NPF10 seria necessário a realização de uma nova caracterização estrutural, por meio do DR-X, contudo, como essa informação não é um dos objetivos do trabalho, tal análise foi postergada para estudos futuros.

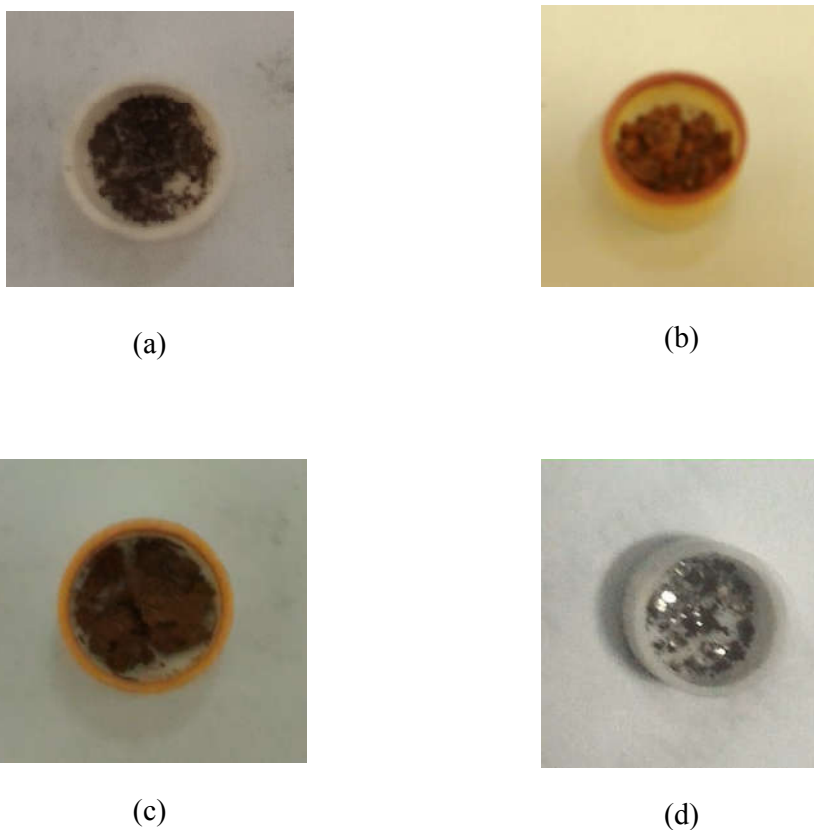


Figura 43. Imagens das amostras após aquecimento no SDT: (a)NPP; (b)NPA3; (c)NPA5 e (d)NPF12.

5.7. Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM – Vibrating Sample Magnetometry)

A magnetometria de amostra vibrante (VSM), em termos gerais, é uma técnica empregada para o estudo de propriedades magnéticas das amostras, em termos qualitativos. Isso porque, em nível macroscópico já é possível visualizar que as nanopartículas de maghemita presentes em cada solução são de fato magnéticas, uma vez que apresentam atração quando um ímã é aproximado (Figura 44).



Figura 44. Fotografias demonstrando, em nível macroscópico, a magnetização das Amostras.

Os valores quali-quantitativos da magnetometria de amostra vibrante estão expressos na Figura 45, a qual demonstra as curvas de magnetização versus campo magnético, em temperatura ambiente (300 K), para todas as amostras (NPP, NPA3; NPA5 e NPF10). Assim, as curvas apresentadas, a essa temperatura, indicam a coexistência de partículas em regimes ferromagnéticos, isto é, com padrão de magnetização remanescente e coercividade relativamente baixa (MOHALLEM e SEARA, 2003).

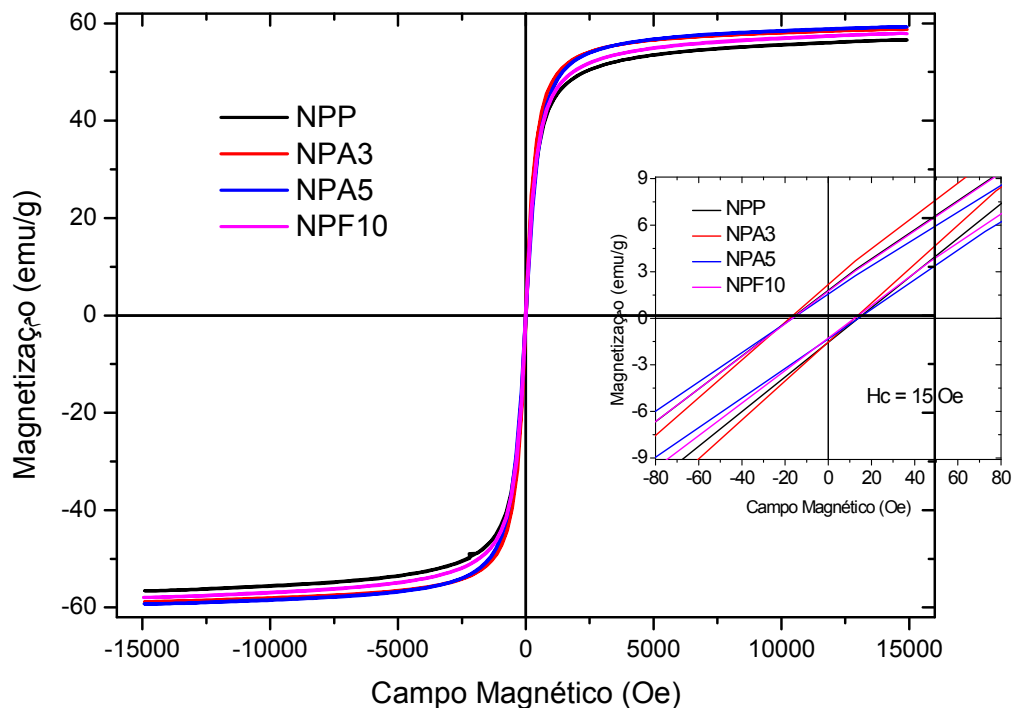


Figura 45. Curvas de magnetização versus campo magnético, em temperatura ambiente (300K), para todas as amostras (NPP, NPA3; NPA5 e NPF10).

A curva de histerese da amostra precursora (NPP) indica que a magnetização de saturação (M_s) da fase sólida do pó da maghemita é de $56,62 \text{ emu.g}^{-1}$; o que indica um valor inferior à maghemita na sua forma “bulk”, que é aproximadamente 70 emu.g^{-1} . Tal diferença pode ser justificada pelo fato da magnetização de saturação está diretamente relacionada com o tamanho das partículas, até um valor máximo, o qual, para amostras com cerca de 20-25% de concentração molar de Fe/Si, corresponde a uma máxima de 31 emu.g^{-1} (SERNA e MORALES, 2013). Contudo, em linhas gerais, o valor de M_s apresentou-se muito similar à outros estudos que caracterizaram nanopartículas de maghemita, incluindo aqueles que realizaram aplicações biomédicas, o que reforça seu mérito para aplicação de hipertermia magnética e comprova sua propriedade magnética (GARCELL, MORALES, *et al.*, 1998; MORALES, GONZÁLES-CARREÑO, *et al.*, 2000; COSTO, BELLO, *et al.*, 2012).

As curvas de magnetização para as amostras NPA3; NPA5 e NPF10 revelam valores de magnetização de saturação na ordem de: $58,85 \text{ emu.g}^{-1}$; $59,29 \text{ emu.g}^{-1}$ e $57,94 \text{ emu.g}^{-1}$, respectivamente. Diante do exposto, é possível observar que a introdução de um ligante, o

qual funcional como surfactante para as nanopartículas, aumentou minimamente a magnetização de saturação, indicando que os revestimentos analisados podem ser utilizados em nanopartículas com fins magnéticos, sem receio que haja perda dessas propriedades. Foi demonstrado também, assim como nas análises de FTIR, que o revestimento de ácido glicurônico apresentou melhor desempenho que a frutose. Entretanto, é importante dizer, que a diferença do valor de magnetização de saturação entre as amostras foi pequena, apesar de observável; o que pode ser atribuída ao efeito do tamanho de partícula.

Outrossim, foi encontrado um valor baixo de campo coercitivo (H_c) para todas as amostras na ordem de 15 Oe, o que infere características de material magnético mole e compatível com nanopartículas de maghemita (MOHALLEM e SEARA, 2003; COSTA, 2013).

5.8. Magneto Hipertermia

As análises em equipamento de magneto hipertermia tiveram como objetivo principal a verificação de aquecimento e o potencial de geração de hipertermia de nanopartículas de maghemita, expostas à um campo eletromagnético conhecido (150 Oe) por 300 segundos.

De acordo com os dados demonstrados nas curvas de hipertermia, expressas pela temperatura versus tempo (Figura 46), foi possível obter a taxa de aquecimento de cada amostra e compará-las com a taxa de aquecimento da água. Nesse caso, a taxa foi obtida pela variação da temperatura das amostras dividida pelo tempo decorrido (300s). Assim, obteve-se uma taxa de 0,014 °C/s para a água; 0,079 °C/s para NPP; 0,087 °C/s para NPA3; 0,067 °C/s para NPA5 e 0,056 °C/s para NPF10. Esses resultados permitem concluir primeiramente que de fato as nanopartículas de maghemita apresentam capacidade de geração de hipertermia magnética, já que foi observado o aumento da temperatura, de forma significativa, sobretudo em comparação com a amostra de água (MilliQ), quando as mesmas são expostas à um campo eletromagnético.

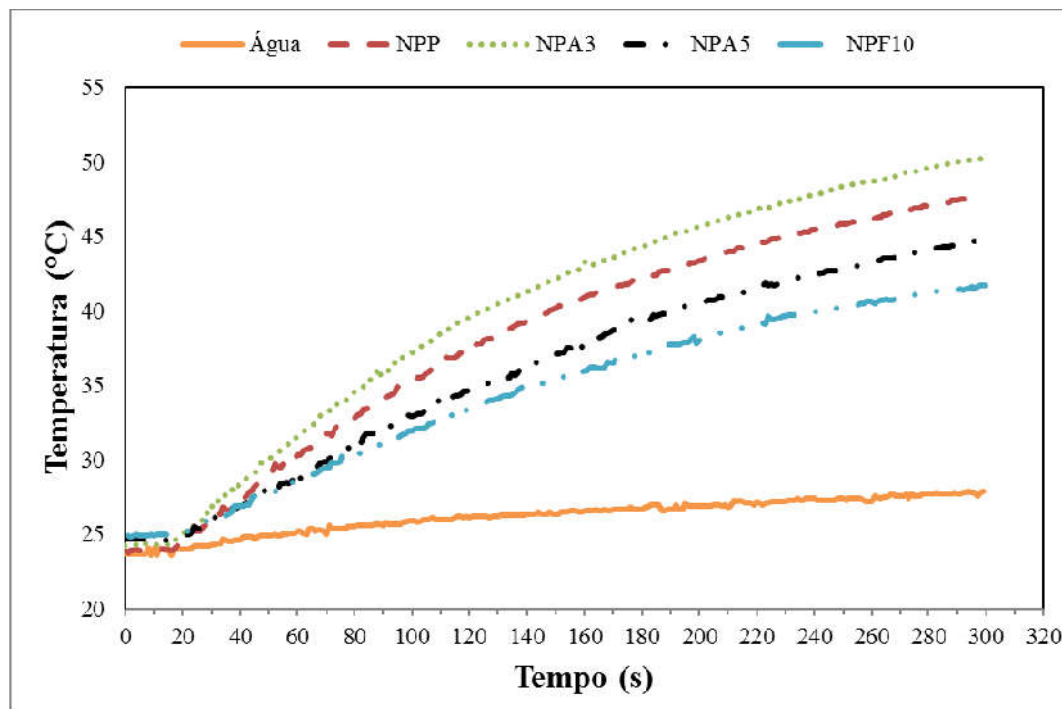


Figura 46. Gráfico de hipertermia magnética, indicando pela variação de temperatura versus o tempo.

Foi observado, também, que a introdução de ligantes não alterou significativamente a capacidade de geração de hipertermia magnética pelas nanopartículas de maghemita, em comparação com a amostra precursora (NPP); o que corrobora com os resultados encontrados pelas análises de magnetometria de amostra vibrante, em que a magnetização de saturação também não decaiu ou sofreu alterações significativas quando em presença do ácido glicurônico ou frutose.

Entretanto, quando comparamos, de modo geral, os resultados apresentados pelas amostras que contém ácido ou frutose, é possível observar que mais uma vez o revestimento de ácido glicurônico apresentou melhores resultados, mesmo em escala diminuta; o que corrobora tanto com dados observados pelo VSM quanto com os observados pelo FTIR.

5.9. Definição de Parâmetros para Hipertermia por Ondas Curta

Após os ensaios de magneto hipertermia e consequente verificação de uniformidade de aquecimento das soluções de nanopartículas, prosseguiu-se para realização de ensaios de hipertermia, através da aplicação de campo magnético alternado pelo aparelho de ondas curtas, com apenas a solução precursora (NPP).

Para tanto, a solução precursora (NPP) foi diluída, com o meio RPMI (meio de cultivo celular), na proporção 1:1 (Solução 1); 1:3 (Solução 2) e “sem diluição” (Solução 3); gerando a formulação de três “soluções” para o referido ensaio. Nesse ensaio, a solução 1 possuiu uma concentração de ferro total de 3,55 mg/mL; a solução 2 uma concentração de 2,36 mg/mL e a solução 3 uma concentração de 7,1 mg/mL (sem diluição).

Tais diluições foram essenciais para definição da melhor concentração e parâmetro de tempo do aparelho de ondas curtas, os quais deverão ser utilizados quando as nanopartículas forem empregadas em bioensaios com aplicação de hipertermia por OC (requerendo aquecimento entre 41 e 46 °C). As tabelas 7, 8, 9 e 10 demonstram os resultados do ensaio, especificando o tempo utilizado, concentrações, temperaturas e tempo de decaimento.

Tabela 7. Ensaio de hipertermia com OC para amostra de NPP diluída na proporção 1:1 (100 µL de meio RPMI e 100 µL de NPP).

SOLUÇÕES DE NPP NA PROPORÇÃO 1:1 (1)				
Tempo	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média^{Desv-pad.}
T_i	27,2 °C	27,3 °C	27,6 °C	27,37^{±0,21}
T_{10'}	37,8 °C	38,1 °C	37,5 °C	37,80^{±0,30}
T_{15'}	39,6 °C	40,2 °C	39,7 °C	39,83^{±0,32}
T_{20'}	42,1 °C	42,0 °C	42,5 °C	42,20^{±0,26}
T_{25'}	43,6 °C	44,2 °C	43,9 °C	43,90^{±0,30}
T_{30'}	46,5 °C	45,6 °C	45,9 °C	46,00^{±0,46}
Tempo de Decaimento:			12 minutos e 43 segundos	

Tabela 8. Ensaio de hipertermia com OC para amostra de NPP diluída na proporção 1:3 (150 µL de meio RPMI e 50 µL de NPP).

SOLUÇÕES DE NPP NA PROPORÇÃO 1:3 (2)				
Tempo	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média^{Desv-pad.}
T_i	27,7 °C	27,5 °C	27,8 °C	27,67^{±0,15}
T_{10'}	36,5 °C	37,0 °C	36,6 °C	36,70^{±0,26}
T_{15'}	37,7 °C	38,0 °C	38,2 °C	37,97^{±0,25}
T_{20'}	38,2 °C	38,0 °C	38,0 °C	38,07^{±0,12}
T_{25'}	40,5 °C	39,6 °C	40,2 °C	40,10^{±0,46}
T_{30'}	42,7 °C	42,6 °C	43,0 °C	42,77^{±0,21}
Tempo de Decaimento:			11 minutos e 30 segundos	

**Tabela 9. Ensaios de hipertermia com OC para amostra de NPP sem diluição (200 µL de NPP).
SOLUÇÕES DE NPP “SEM DILUIÇÃO” (3)**

Tempo	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média ^{Desv-pad.}
T _i	27,2 °C	27,8 °C	27,6 °C	27,53 ^{±0,31}
T _{10'}	42,5 °C	42,3 °C	42,7 °C	42,50 ^{±0,20}
T _{15'}	44,5 °C	44,3 °C	44,5 °C	44,43 ^{±0,12}
T _{20'}	46,2 °C	47,1 °C	47,0 °C	46,77 ^{±0,49}
T _{25'}	48,2 °C	49,0 °C	48,8 °C	48,67 ^{±0,42}
T _{30'}	54,3 °C	54,6 °C	53,2 °C	54,03 ^{±0,74}
Tempo de Decaimento:			13 minutos e 40 segundos	

**Tabela 10. Ensaios de hipertermia com OC para o meio RPMI (200 µL de meio).
MEIO RPMI (CONTROLE)**

Tempo	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média ^{Desv-pad.}
T _i	27,3 °C	27,5 °C	27,3 °C	27,37 ^{±0,12}
T _{10'}	30,0 °C	31,0 °C	30,6 °C	30,53 ^{±0,50}
T _{15'}	33,8 °C	33,6 °C	34,0 °C	33,80 ^{±0,20}
T _{20'}	36,2 °C	36,0 °C	36,3 °C	36,17 ^{±0,15}
T _{25'}	37,0 °C	37,6 °C	37,3 °C	37,30 ^{±0,30}
T _{30'}	39,0 °C	39,3 °C	39,7 °C	39,33 ^{±0,35}
Tempo de Decaimento:			9 minutos e 25 segundos	

Em linhas gerais e corroborando com os demais ensaios de hipertermia e magnetização, os resultados da aplicação de ondas-curtas para produzir aquecimento se apresentaram positivos e demonstram a possibilidade de utilização das nanopartículas de maghemita como um recurso para geração de hipertermia em aplicações biomédicas, mediante o uso auxiliar de campo eletromagnético (BUMB e SATOSKAR, 2011; LOBO, SOARES, *et al.*, 2006; WANG, BILLONE e MULLETT, 2013).

Todas as soluções/concentrações com nanopartículas foram eficientes na produção de calor, contudo, a diluição na proporção de 1:1 (100 µL de solução de nanopartículas associada com 100µL de meio RPMI) demonstrou o resultado mais adequado, pois apresentou estabilidade durante o aquecimento, além de atingir em média 46 °C em 30 minutos de aplicação do campo magnético, temperatura essa, que juntamente com o tempo de 30

minutos, são considerados, na maioria da literatura, adequados para produção de hipertermia e, conseqüentemente, devem ser os parâmetros adotados para realização dos bioensaios (DEATSCH e EVANS, 2014; DI CORATO, ESPINOSA, *et al.*, 2014; FRANCISQUINI, SCHOENMAKER e SOUZA, 2014; PITAKSUTTEEPONG, 2016).

A amostra controle (meio de cultura RPMI) quando comparada às amostras com nanopartículas produziu aquecimento insuficiente para um potencial tratamento via hipertermia, já que não aquece sequer até a faixa mínima de temperatura de 41°C para geração de tal tratamento, podendo a temperatura atingida (39,33°C) ser considerada, no máximo, na faixa da diatermia gerada pelo OC.

5.10. Bioensaio de Atividade Leishmanicida *In Vitro* – Formas Promastigotas

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, os ensaios *in vitro*, sobretudo relacionados à citotoxicidade, são os primeiros testes para avaliar a biocompatibilidade e eficácia de qualquer material para fins biomédicos (TECHNICAL COMMITTEE: ISO/TC 194, 2013). Por conseguinte, caso seja comprovada a não toxicidade da substância, ou método avaliado, somada a sua efetividade biológica, é que o estudo deve ter prosseguimento para ensaios em modelo animal (ROGERO, LUGÃO, *et al.*, 2003). Nesse sentido, o percentual de viabilidade celular (parasitas viáveis das *Leishmania*) e Eficácia (relacionada à mortalidade parasitária) foram determinados através do método de exclusão de azul de Tripán contra as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, conforme demonstrado na tabela 11.

Tabela 11. Dados gerais do bioensaio de Eficácia leishmanicida para todas as amostras de nanopartículas e todos os controles, sem e com o uso da hipertermia por ondas curtas.

Substâncias	Uso do OC	Contagem Parasitária (média)		Viabilidade Celular	Eficácia (E%)	
		P*. Vivo	P*. Morto			
Placa A	NPP	-	1,60.10 ⁵	1,67.10 ⁴	91 %	9 %
	NPA3	-	7,33.10 ⁴	1,30.10 ⁵	36 %	64 %
	NPA5	-	9,67.10 ⁴	8,67.10 ⁴	53 %	47 %
	NPF10	-	2,63.10 ⁵	2,33.10 ⁴	92 %	8 %
Placa B	CA3	-	0,00	2,97.10 ⁵	0 %	100 %
	CA5	-	0,33.10 ⁴	3,40.10 ⁵	1 %	99 %
	CF	-	1,86.10 ⁵	2,0.10 ⁴	90 %	10 %
	CM	-	0,00	0,00	—	—
	CP	-	1,80.10 ⁵	0,33.10 ⁴	98 %	2 %
Placa C	NPP	+	0,67.10 ⁴	2,0.10 ⁵	3 %	97 %
	NPA3	+	0,00	1,53.10 ⁵	0 %	100 %
	NPA5	+	0,67.10 ⁴	1,13.10 ⁵	6 %	94 %
	NPF10	+	3,0.10 ⁴	8,33.10 ⁴	26 %	74 %
Placa D	CA3	+	0,00	4,63.10 ⁵	0 %	100 %
	CA5	+	0,00	4,37.10 ⁵	0 %	100 %
	CF	+	5,33.10 ⁴	5,57.10 ⁵	9 %	91 %
	CM	+	0,00	0,00	—	—
	CP	+	1,67.10 ⁴	5,37.10 ⁵	3 %	97%

*P= Parasita; (-)=ausência de ondas Curtas (OC); (+)= presença de OC.

Tabela 12. ANOVA TWO WAY entre os tratamentos propostos: nanopartículas e controle parasitário, com e sem o uso das ondas curtas.

Fatores	GL	SQ	QM	F (valor)	Pr(>F)
Ondas Curtas (OC)	1	33701	33701	969,94	-
Substâncias (Nanopartículas + CP)	4	6473	1618	46,57	-
OC x Substâncias	4	3913	978	28,15	5,78.10 ⁻⁰⁸ ***
Resíduo	20	695	35		

***: Significância menor que 0,0001; GL= Grau de Liberdade; SQ= Soma dos Quadrados; QM= Quadrado Médio; CP= Controle Parasitário.

A Tabela 12 apresenta os resultados da ANOVA TWO WAY, demonstrando que houve significância estatística ($p=5,78.10^{-08}$) para a interação entre as substâncias avaliadas (NP's) e a utilização do OC, indicando que quando associado os dois fatores há eficácia leishmanicida comprovada, a qual provavelmente está associada a morte do patógeno pelo aquecimento, já que, conforme Tabela 13, todas as amostras de NP's associadas ao OC demonstraram taxas de aquecimento na ordem hipertérmica (entre 41 e 46°C), o que corrobora com os estudos de BUMB e SATOSKAR, 2011; BUMB, PRASAD, *et al.*, 2013; LOBO, SOARES, *et al.*, 2006; ARONSON, WORTMANN e BYRNE, 2010 e MONGE-

MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013, os quais também relacionam à destruição do parasita ao efeito térmico do calor, porém com aplicação de outra técnica termoterapêutica — termoterapia por radiofrequência (RFHT).

Entretanto, como a técnica da RFHT é realizada com aplicação da radiofrequência por aproximadamente 1cm^2 , ela possui a limitação de tratamento para lesões de pequenas dimensões, sendo tal restrição diretamente associada ao modo de geração do aquecimento e não ao efeito térmico (BUMB, PRASAD, *et al.*, 2013). Desse modo, como o aparelho de ondas curtas possui uma área para o tratamento em torno de 40cm^2 (associada aos eletrodos), não deverá existir limitação dimensional para as lesões a serem tratadas, o que acrescenta vantagem à utilização do OC para o efeito leishmanicida. Além disso, o meio físico de tratamento e aquecimento do OC é baseado na aplicação de ondas e campos eletromagnéticos alternados, o que está relacionado aos atuais modelos e estudos de tratamentos oncológicos por hipertermia, devido à fragilidade da célula alvo ao aquecimento e a possibilidade de carreação de fármacos quando nanopartículas magnéticas são associadas aos efeitos de campo eletromagnético (COSTO, BELLO, *et al.*, 2012; LOPEZ, TEJEIRO e RIVAS, 2013; PITAKSUTTEPONG, 2016).

Tabela 13. Apresentação dos dados de temperatura e pH para o bioensaio de viabilidade celular em todas as amostras de nanopartículas e todos os controles.

Substâncias	Uso do OC	Eficácia (E%)	Temperatura Inicial (Média) - °C	Temperatura Final Média - °C	pH	
Placa A	NPP	-	9 %	25,5	25,4	6,5
	NPA3	-	64 %	25,4	25,4	6,0
	NPA5	-	47 %	25,5	25,4	6,0
	NPF10	-	8 %	25,5	25,6	6,5
Placa B	CA3	-	100 %	25,5	25,5	4,5
	CA5	-	99 %	25,6	25,5	5,0
	CF	-	10 %	25,6	25,6	8,0
	CM	-	—	25,5	25,4	7,5
	CP	-	2 %	25,6	25,5	7,5
Placa C	NPP	+	97 %	25,6	46,1	6,5
	NPA3	+	100 %	25,4	46,0	6,0
	NPA5	+	94 %	25,3	45,1	6,0
	NPF10	+	74 %	25,6	45,0	6,5
Placa D	CA3	+	100 %	26,0	40,0	4,5
	CA5	+	100 %	25,6	39,5	5,0
	CF	+	91 %	25,7	39,8	8,0
	CM	+	—	25,6	39,5	7,5
	CP	+	97%	25,6	39,8	7,5

(-)=ausência de ondas Curtas (OC); (+)= presença de OC.

A Tabela 14 demonstra o prosseguimento metodológico estatístico para a comparação de médias da eficácia leishmanicida nas diferentes substâncias com a utilização do OC, através do teste de Tukey. Tal teste foi aplicado devido a interação entre os fatores ter sido significativa, desejando-se verificar se houve diferença estatística entre cada métodos.

Tabela 14. Comparação entre as médias da eficácia leishmanicida entre as nanopartículas e Controle Parasitário (CP) com aplicação do ondas curtas.

Substâncias com Ondas Curtas	Eficácia (E%)- Média
NPA3	100,00000 ^a
NPA5	97,05514 ^a
NPP	96,78587 ^a
NPF10	94,40559 ^{a,b}
CP	76,34921 ^b

Nesse caso, foi verificado que entre os tratamentos com OC, considerado o nível de significância de 0,05, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, exceto para a amostra NPF10, a qual apresentou mesmo nível de significância que o controle parasitário, demonstrando menor potencial leishmanicida para o bioensaio em formas promastigotas.

Desse modo, em termos gerais, todas as amostras de nanopartículas, com exceção da NPF10 (contendo frutose), apresentaram alta significância estatística e baixíssimos percentuais de viabilidade parasitária, o que representa uma taxa de mortalidade do parasita na ordem de 96 à 100%, fazendo com que tanto as nanopartículas de maghemita puras quanto as nanopartículas revestidas com ácido glicurônico, sobretudo na proporção de 1:3 (NPA3), sejam potenciais soluções para utilização no tratamento de leishmaniose cutânea via hipertermia magnética por OC.

Contudo, é importante dizer que a utilização de ligantes não se deve apenas pelo fator químico, para prevenção da foto-oxidação ou agregação das NP's; mas também pelo fator biológico, de reconhecimento celular, em que a inserção dos ligantes pode facilitar a endocitose e, conseqüentemente, a entrada das NP's dentro da célula alvo, o que permite seletividade e potencializa o efeito do tratamento com emprego de nanopartículas (SILVA, OLIVEIRA, *et al.*, 2011; WAHAJUDDIN e ARORA, 2012). Dessa forma, mesmo que o teste estatístico não apresente diferença entre a NP sem revestimento e com revestimento, é importante salientar que apenas os ensaios com formas amastigotas (intracelular) irão elucidar o benefício ou não da utilização desses ligantes.

A Tabela 15 demonstra a comparação de médias da eficácia leishmanicida nas diferentes substâncias sem a utilização do OC, através do teste de Tukey, indicando baixa eficácia leishmanicida para todas as amostras.

Tabela 15. Comparação entre as médias da eficácia leishmanicida entre as nanopartículas e CP sem a aplicação do ondas curtas.

Substâncias sem OC	Eficácia (E%)- Média
NPA3	63,850461 ^a
NPA5	47,265222 ^b
NPP	8,465608 ^c
NPF10	8,258297 ^c
CP	1,587302 ^c

Dentre as substâncias (sem utilização do OC), a solução NPA3 apresentou o maior potencial leishmanicida (média), diferindo de todas as outras amostras, inclusive do CP. A eficácia da NPA5 diferiu das amostras de NPP, NPF10 e também CP. Os resultados indicaram, ainda, que não houve diferença estatística entre a eficácia leishmanicida das amostras NPP, NPF10 e CP (todos sem o uso do OC e conseqüentemente sem a geração de aquecimento).

Tais resultados evidenciam que para as nanopartículas sem aplicação da hipertermia por ondas curtas, cuja temperatura não ultrapassou 25,6°C (observar na Tabela 13), a eficácia leishmanicida foi baixa, já que houve um menor percentual de mortalidade em comparação com as amostras de nanopartículas com aplicação do OC; o que fortalece a associação entre eficácia leishmanicida das NP's ao calor e, conseqüentemente, à geração da hipertermia por um campo eletromagnético alternado.

Foi possível perceber ainda, através dos dados gerais de frequência simples (Tabela 11), que entre os controles negativos (contendo as substâncias de ácido glicurônico e frutose), houve uma alta mortalidade parasitária (100%), associada à acidez gerada pelas diferentes concentrações do ácido glicurônico. A moderada viabilidade parasitária, observadas nas amostras NPA3 e NPA5 sem a utilização do OC é atribuída também ao revestimento ácido, embora com resultados bem abaixo dos observados nos controles, já que as soluções de nanopartículas foram dializadas, sendo sua acidez neutralizada, conforme demonstrado na Tabela 13 (variável pH).

A substância frutose pouco interferiu na mortalidade parasitária, tanto no que tange sua utilização como revestimento, quanto na amostra controle (CF), apresentando a maior viabilidade celular depois do controle parasitário (CP) sem o OC. Pressupõem-se, então, que a

amostra de nanopartículas revestidas com frutose (NPF10) não apresentou tão bom desempenho, quanto as demais amostras, porque trata-se de um açúcar (em concentração não tóxica), que, como tal, influenciou positivamente na sobrevivência das formas promastigotas de *Leishmania*, já que as mesmas possuem afinidades por moléculas dessa natureza, que possivelmente lhes confere certa proteção, similar ao evidenciado pelo Lipofosfoglicano (LPG), o qual é glicoconjugado na superfície das formas promastigotas de *Leishmania*, estando localizado em todo o parasito, inclusive no flagelo, e envolvido no processo protetivo do protozoário contra agentes externos (PIMENTA, SARAIVA, *et al.*, 1994; DESCOTEAUX e TURCO, 1999; ILG, 2000).

Abaixo, a Figura 47 representa de modo sucinto a eficácia leishmanicida das diferentes nanopartículas e do CP, com e sem o uso do OC, sendo possível visualizar claramente a superioridade do efeito leishmanicida com a utilização do OC e, conseqüentemente, geração de hipertermia.

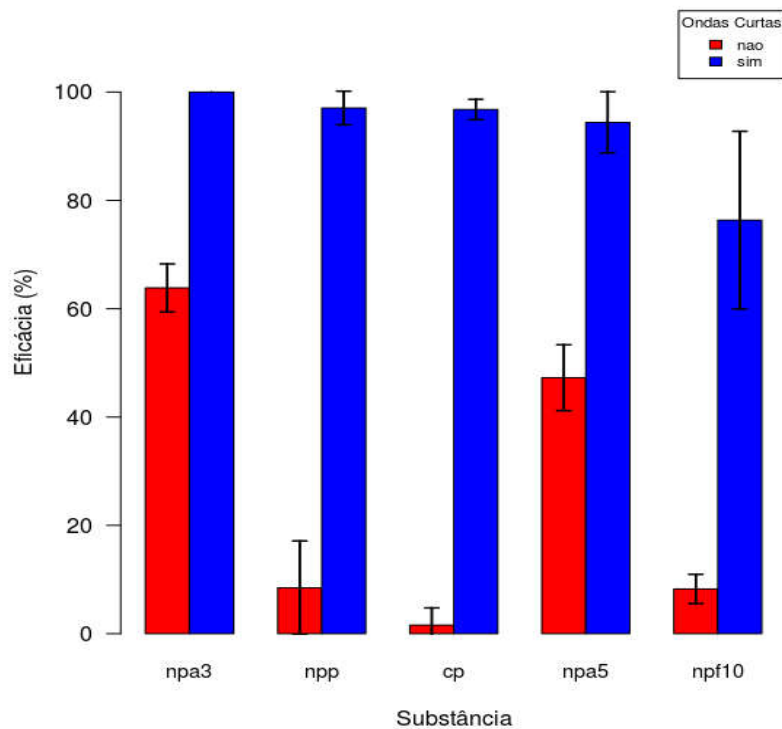


Figura 47. Comparação entre a eficácia leishmanicida (E %) das diferentes amostras avaliadas (NPA3, NPA5, NPP e NPF10) e controle parasitário CP, com e sem a aplicação do OC.

Foi possível visualizar, da mesma forma, que a amostra NPA3 apresentou o melhor resultado para a eficácia leishmanicida, o que corrobora com os dados encontrados no processo de caracterização, o qual demonstrou, praticamente em todas as técnicas, resultados

mais satisfatórios para a NPA3, incluindo melhor adsorção do ligante e uma das melhores magnetizações de saturação.

Em linhas gerais, foi observado que em todas as situações que tiveram a intervenção do OC e, conseqüentemente, a elevação da temperatura, houve morte parasitária, indicando que a aplicação isolada do OC pode ser uma via de tratamento para leishmaniose cutânea, porém potencializada quando associada às NP's.

Desse modo, os achados possibilitam inferir que a utilização do método proposto (NP's+OC) é um potencial recurso físico e tópico para o tratamento de lesões cutâneas e mucocutâneas geradas pela leishmaniose. Tratamento este, que poderá ser realizado concomitantemente à terapêutica conservadora ou utilizado separadamente em pacientes que não respondam ao tratamento de primeira escolha e/ou que tenham que interrompê-lo, devido sua alta toxicidade ou efeitos colaterais. Contudo, é importante asseverar que os resultados encontrados pelo referido bioensaio (*in vitro – formas promastigotas*) são apenas norteadores para prosseguimento metodológico do potencial tratamento proposto, não devendo ser, em qualquer situação, considerados com resultados finais e fixos para aplicações em humanos.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram obtidas diferentes nanopartículas de maghemita pelo método de co-precipitação, em que se obtiveram amostras de nanopartículas sem revestimento, denominada amostra precursora, e nanopartículas revestidas com ácido glicurônico e frutose. Posteriormente as amostras foram caracterizadas e, então, foi realizado o Bioensaio de Atividade Leishmanicida *in vitro*, permitindo a conclusão dos seguintes pontos:

- ✓ A caracterização das amostras de nanopartículas, tanto via DLS, quanto por MEV-FEG, indicaram um diâmetro médio de partícula na ordem de 60nm e a microscopia revelou ainda uma morfologia esférica regular em todas as amostras, independente do ligante associado.
- ✓ A espectroscopia de Mössbauer e DR-X esclareceram o estado de oxidação do ferro, concluindo que a fase presente era de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).
- ✓ As análises térmicas evidenciaram a degradação tanto da maghemita quanto dos ligantes.
- ✓ Os Espectros de FTIR demonstraram melhores resultados para adsorção do ligante na amostra com maior concentração de ácido (NPA3).
- ✓ As curvas de histerese obtidas pelo VSM demonstraram que a magnetização de saturação (M_s) das amostras gira em torno de 56,62 à 59,9 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$. Foi demonstrado, assim como nas análises de FTIR, que o revestimento de ácido glicurônico apresentou melhor desempenho.
- ✓ Os resultados dos testes de magneto hipertermia demonstraram a capacidade de geração de aquecimento de todas as NP's (quando exposta a um campo eletromagnético alternado).
- ✓ Os resultados do ensaio de hipertermia por ondas-curtas demonstraram parâmetros ideais do OC para: tuning de 100%, modo contínuo e time de 30 minutos, além da proporção de 1:1 de NP's e RPMI nos bioensaios *in vitro*.
- ✓ O bioensaio com a utilização do OC demonstrou que todas as soluções contendo nanopartículas de maghemita apresentaram-se viáveis para produção de hipertermia, já que a temperatura média em todas as amostras ficou em torno de 45 e 46,1 °C. Quanto a eficácia leishmanicida, todas as amostras de nanopartículas apresentaram significância estatística ($p= 5,78.10^{-08}$), com taxa de mortalidade do parasita na ordem de 94 à 100%, sobretudo na proporção de 1:3 (NPA3).

- ✓ Dessa forma, os resultados possibilitam inferir que a utilização do método proposto (Hipertermia por aplicação de NP's+OC) pode ser um potencial recurso físico para o tratamento de lesões de leishmaniose cutâneas e mucocutâneas, com aplicação tópica; o qual poderá ser utilizado concomitantemente à terapêutica conservadora ou separadamente em pacientes que não respondam ao tratamento de primeira escolha e/ou que tenham que interrompê-lo, devido sua alta toxicidade ou efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; VINAY, K.; NELSON, F. **Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 9ª. ed. Rio de Janeiro/RJ: Elsevier, 2016.
- ALI, K. et al. Preparation of superparamagnetic maghemite nanoparticles by wet chemical route and investigation of their magnetic and dielectric properties. **Current Applied Physics**, v. 15, p. 925-929, 2015.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, May 2012.
- ALVES, T. M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de óxidos de ferro para aplicações biomédicas**. Dissertação de Mestrado. UNICAMP. Campinas/SP. 2007.
- ARCE, G. L. A. et al. Avaliação da Eficiência da Extração de Mg para Carbonatação Mineral Indireta Utilizando Sais de Amônia. **X Congresso Brasileiro e IV Congresso Pan Americano de Análise Térmica e Calorimetria**, São Paulo/SP, 2016.
- ARONSON, N. E.; WORTMANN, G. W.; BYRNE, W. R. A randomized controlled trial of local heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous Leishmania major infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, p. 628, 2010.
- BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 1, p. 1--10, 2011.
- BARRY, S. E. Challenges in the development of magnetic particles for therapeutic applications. **International Journal of Hyperthermia**, v. 24, n. 6, p. 451-466, 2008.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle, v. 7, n. 3, 2004.
- BASTOS, M. M. et al. O uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 257-267, 2012.
- BERGER, B. A. et al. Cost-effectiveness of meglumine antimoniate versus miltefosine caregiver DOT for the treatment of pediatric cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** , v. 11, n. 4, 2017.
- BERNAL, C. et al. A Influência de Fatores Experimentais nos Resultados de Análises Termogravimétricas. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.
- BLANCO, V. M. et al. Clinical and Epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis in Colombian Children: Considerations for Local Treatment, v. 89, n. 2, p. 359-364, 2013.

- BRANQUINHO, L. C. et al. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. **Scientific Reports**, v. 3, n. 2887, 2013.
- BRISTOW, C. A. et al. Potencial of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 162, n. 3, 2006.
- BUMB, R. A. et al. Long-term efficacy of single-dose radiofrequency-induced heat therapy vs. intralesional antimonials for cutaneous leishmaniasis in India. **British Journal of Dermatology**, v. 168, p. 1114-1119, 2013.
- BUMB, R. A.; SATOSKAR, A. R. Radiofrequency-induced heat therapy as first-line treatment for cutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 9, p. 623-625, 2011.
- CALLISTER JR., W. D.; RETHWISCH, D. G. **Fundamentos da Ciência e Engenharia de Materiais - Uma Abordagem Integrada**. 4ª. ed. [S.l.]: LTC, 2014.
- CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quím. Nova**, v. 37, n. 3, 2014.
- CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos. [S.l.]. 2010.
- CASTRO, M. D. et al. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 4, 2017.
- CASTRO, V. F.; QUEIROZ, A. A. A. Síntese e caracterização bioinspirada de partículas superparamagnéticas. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 6, n. 2, p. 109-112, 2012.
- CAVALHEIRO, E. T. G. et al. A Influência de Fatores Experimentais nos Resultados de Análises Termogravimétricas. **Química Nova**, v. 18, n. 3, p. 305-308, 1995.
- CHEHADE, M.; SRIVASTAVA, A. K.; BULTE, J. W. Co-Registration of Bioluminescence Tomography, Computed Tomography, and Magnetic Resonance Imaging for Multimodal In Vivo Stem Cell Tracking. **Tomography**, v. 2, n. 2, p. 159-165, 2016.
- COFITO. Atividade de Saúde Regulamentada pelo Decreto-Lei 938/69. **Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional**, 2016. Disponível em: <www.coffito.gov.br>. Acesso em: 26 dezembro 2016.
- COSTA, J. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, n. 79, p. 70-83, 2009.

- COSTA, T. C. C. **Síntese de nanopartículas de magnetita via decomposição térmica em meio não-aquoso**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. [S.l.]. 2013. (Tese de doutorado N° 117).
- COSTO, R. et al. Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles for biomedical applications: improving the colloidal and magnetic properties. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 178-185, 2012.
- CRISTÁLIA - PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA. Anfotericina B - Bula do remédio, 2008. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/8010/anfotericina_b.htm>. Acesso em: 12 agosto 2016.
- CURTI, M. C. M. et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noreoeste do Estado do Paraná. **Rev. Cienc. Farm. Básica. Apl.**, v. 30, n. 1, p. 63-68, 2009.
- DAREZERESHKI, E. One-Step Synthesis of Hematite (α -Fe₂O₃) Nanoparticles by Direct Thermal Decomposition of Maghemite. **Materials Letters**, v. 65, p. 642-645, 2011.
- DEATSCH, A. E.; EVANS, B. A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 354, p. 163-172, 2014.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO, T. S. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochim Biophys Acta.**, p. 341-352, 1999.
- DI CORATO, R. et al. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6400-6411, 2014.
- DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Drug Development Research**, v. 67, n. 1, p. 55-60, 2006.
- DRAPER O, H. A. J. A. M. T. J. M. Muscle Heating with megapulse II shortwave diathermy and rebound diathermy. **Journal of Athletic Training**, p. 477-482, 2013.
- DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo/SP: Artliber, 2012.
- DUTTA, S. et al. Photodynamic sensitization of Leishmania Amazonensis in both extracellular and intracellular stages with aluminium phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 4474-84, 2005.
- ESHGHI, H. et al. Protoporphyrin IX—gold nanoparticle conjugates as an efficient photosensitizer in cervical cancer therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 304-312, 2013.

- FAN, R. Z. et al. The impact of nanopharmaceuticals on healthcare and regulation. In: FAN, R. Z., et al. **Nanomedicine: Nanostructure Science and Technology**. New York: Springer Science, 2014. Cap. 17.
- FAROKHZAD, O. C. Nanotechnology for drug delivery: The perfect partnership. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 5, p. 927-929, 2008.
- FERREIRA, A. B. H. **Dicionário Aurélio da língua portuguesa**. 5ª. ed. Curitiba: Positivo, 2010.
- FIGUEIRA, L. P. et al. Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Rev Patol Trop**, v. 43, n. 2, p. 173-181, 2014.
- FILIPPONI, L.; SUTHERLAND, D. Nanotechnology: principles, applications, implications and hands-on activities EUROPEAN COMMISSION Directorate-General for Research and Innovation Industrial technologies, 2014. Disponível em: <http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/nanohands-on-activities>. Acesso em: 21 maio 2016.
- FISHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 18, p. 565-571, 2007.
- FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas magnéticas e suas aplicações. In: ALVES, W. A. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**. São Paulo: Atheneu, 2014. Cap. 14, p. 269-289.
- FRANCO, A. M. R. et al. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, 2016.
- GARCELL, L. et al. Interfacial and rheological characteristics of maghemite aqueous suspensions. **J.Colloid Inter. Sci.**, v. 205, p. 470-475, 1998.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana: Artigo de Atualização. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- HACHTEL, J. A. et al. Gold nanotriangles decorated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a compositional and microstructural study. **Faraday Discuss.**, Jul 2016.
- HAEGELE, J. et al. Multi-color magnetic particle imaging for cardiovascular interventions. **Phys Med Biol.**, v. 61, n. 16, p. N415-N426, 2016.
- HARI-BALA et al. Controlling the particle size of nanocrystalline titania via a thermal dissociation of substrates with ammonium chloride. **Materials Letters**, v. 60, p. 494-498, 2006.

- HERNANDEZ, R. et al. In situ synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles in semi-interpenetrating polymer networks derived from lginate: influence of the network morphology. **Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)**, v. 50, n. 2, p. 283-284, 2009.
- ILG, T. Proteophosphoglycan of Leishmania. **Parasitol Today**, v. 16, n. 11, p. 489-497, 2000.
- JE., A. **Eletrotermofototerapia**. [S.l.]: Andreoli, 2015.
- JENNINGS, Y. L. et al. Phenotypic characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, Leishmania (Viannia) guyanensis × Leishmania (Viannia) shawi shawi. **Parasite**, v. 21, n. 39, 2014.
- JUNAID, A. J. N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with infrared heat. **International Journal of Dermatology**, v. 25, n. 7, p. 470-472, setembro 1986.
- KNOBEL, M. et al. Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: a review on ideal and real systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 6, p. 2836-2857, 2008.
- KUNZ, P. C. et al. Metal carbonyls supported on iron oxide nanoparticles to trigger the CO-gas transmitter release by magnetic heating. **Chem. Commun.**, n. 49, p. 4896-4898, 2013.
- KUNZMANN, A. et al. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1810, n. 3, p. 361-373, 2011.
- KUZMENKO, V. et al. Ammonium chloride promoted synthesis of carbon nanofibers from electrospun cellulose acetate. **Carbon** 67, p. 694-603, 2014.
- LEPENIES, B.; YIN, J.; SEEBERGER, H. P. Applications of synthetic carbohydrates to chemical biology. **Current opinions in chemical biology**, v. 14, p. 404-411, 2010.
- LÉVY, M. et al. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. **Nanotechnology**, v. 21, n. 39, 2010.
- LEVY, M. et al. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 3988-99, 2011.
- LITTER, M. I.; BLESÁ, M. A. Photodissolution of iron oxides. IV. A comparative study on the photodissolution of hematite, magnetite, and maghemite in EDTA media. **Can. J. Chem.**, v. 70, p. 2502-2510, 1992.

- LOBO, I. M. F. et al. Heat therapy for cutaneous leishmaniasis elicits a systemic cytokine response similar to that of antimonial (Glucantime) therapy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 642-649, 2006.
- LOPEZ, L. et al. Thermotherapy: an alternative for the treatment of american cutaneous leishmaniasis. **Trials**, v. 13, n. 58, 2012.
- LOPEZ, M. B.; TEIJEIRO, A.; RIVAS, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. **Reports of practical oncology and radiotherapy**, v. 18, n. 6, p. 397-400, 2013.
- LUPI, O. et al. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 6, p. 897-925, June 2009.
- LYUBUTIN, I. S. et al. Structural, magnetic and electronic properties of Fe_{1+x}Ga_{2-x}O₄ nanoparticles synthesized by the combustion method. **Phys Chem Chem Phys**, 2016.
- MAHMOUDI, M. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 63, n. 1-2, p. 24-46, 2011.
- MAHMOUDI, M.; SERPOOSHAN, V.; LAURENT, S. Engineered nanoparticles for biomolecular imaging. **Nanoscale**, v. 3, p. 3007-3026, 2011.
- MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nanoseries**. User Manual. [S.l.]. 2009.
- MARSH, A. What is nanotechnology? **Universit of South Carolina**, 2012. Disponível em: <http://scholarcommons.sc.edu/imm_section5/8>. Acesso em: 12 julho 2016.
- MARTINEZ-GONZÁLEZ, R.; ESTELRICH, J.; BUSQUETS, M. A. Liposomes Loaded with Hydrophobic Iron Oxide Nanoparticles: Suitable T₂ Contrast Agents for MRI. **Int J Mol Sci.** , v. 17, n. 8, 2016.
- MASOTI, A. et al. Synthesis and characterization of polyethlenimine-based iron oxide composites as novel contrast agents for MRI. **Magn Reson Mater Phy**, v. 22, p. 77-87, 2009.
- MENDES, P. M. F. **Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em magnetite para aplicações na entrega de fármacos antitumorais**. Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas. Universidade do Milho. Escola de Ciências. [S.l.]. 2013.
- MESSIAS, I. A.; OKUNO, E.; COLACIOPPO, S. Exposição ocupacional de fisioterapeutas aos campos elétrico emagnético e a eficácia das gaiolas de Faraday. **Rev Panam Salud Publica**, v. 30, n. 4, p. 309-316, 2011.
- MIRZA, I. M. et al. A study of dielectric, optical and magnetic characteristics of maghemite nanocrystallites. **Materials Chemistry and Physics**, v. 164, p. 183-187, 2015.

- MOHALLEM, N. D. S.; SEARA, L. M. Magnetic nanocomposite thin films of NiFe₂O₃/SiO₂ prepared by sol-gel process. **Appl Surf Sci**, v. 214, p. 143-150, 2003.
- MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, p. 1889–1920, 2013.
- MORALES, M. P. et al. Magnetic iron oxide/mullite nanocomposite stable up to 1400°C. **Solid State Chem.**, v. 155, p. 458-462, 2000.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7^a. ed. Rio de Janeiro/RJ: Elsevier, 2014.
- NAZIR, S. et al. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 1, p. 19-34, 2014.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
- NOLDIN JUNIOR, J. H. **Modelo termoquímico da auto-redução em fornos de cuba**. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica. PUC-Rio. Rio de Janeiro. 2007.
- NUNES, C. S. A. et al. Leishmaniose mucosa: considerações epidemiológicas e de tratamento. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 6, n. 18, p. 52-56, 2011.
- OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>>. Acesso em: 18 Abril 2016.
- PAMAR, H. et al. Size dependent heating efficiency of iron oxide single domain nanoparticles. **Procedia Engineering**, v. 102, p. 527-533, 2015.
- PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, n. 13, 2003.
- PELLISSARI, D. et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 107-110, jan-mar 2011.
- PIMENTA, P. F. P. et al. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of Leishmania is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 9155-9159, 1994.
- PITAKSUTTEPONG, T. Nanotechnology: Effective topical delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 16-17, 2016.

- PRASAD, N.; GHIYA, B. C.; BUMB, R. A. Heat, oriental sore, and HIV. **Lancet**, v. 377, n. 610, 2011.
- PRENTICE, W. E. **Modalidades terapêutica para fisioterapeutas**. 4^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- PUVVADA, N. et al. Aqueous route for the synthesis of magnetite nanoparticles under atmospheric air: functionalization of surface with fluorescence marker. **Toxicol. Res.**, v. 1, p. 196-200, 2012.
- R CORE TEAM. A language and environment for statistical, 2016.
- RANAWAKA, R. R.; WEERAKOON, H. S.; OPHATELLA, N. Liquid nitrogen cryotherapy on Leishmania donovani cutaneous leishmaniasis. **J. Dermatolog. Treat.**, v. 22, p. 241-245, 2011.
- RATH, S. et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.
- REITHINGER, R.; MOHSEN, M.; WAHID, M. Efficacy of thermotherapy o treat cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica in Kabut, Afghanistan: a randomozed, controlled trial. **Clin Infect Dis**, v. 40, p. 1148-1155, 2005.
- RESADORE, F. et al. Phlebotomine Sand Fly Composition (Diptera: Psychodidae) and Putative Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Porto Velho Municipality, Western Amazon, Brazil. **J Med Entomol.** , Feb. 2017.
- RODRIGUES, A. P. D. **Efeito in vitro e in vivo do 5-hidroxi--hidroximetil-gama-pirona durante a infecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis**. Universidade Federal do Pará. Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular. [S.l.]. 2013. (Tese).
- ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparatico entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.
- ROONASI, P.; HOLMGREN, A. A Fourier TransformInfrared (FTIR) and Thermogravimetric Analsis (TGA) study of Oleate adsorbed on Magnetite Nanoparticle surface. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 5891-5895, 2009.
- ROQUE AL, J. A. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** 3, p. 251-262, 2014.
- SADEGHIAN, G.; NILFROUSHZADEH, M. A.; IRAJI, F. Efficacy of local heat therapy by radiofrequency in the treatment of cutaneous leishmaniasis, compared with intralesional injection of meglumine antimoniate. **Clin Exp Dermatol**, v. 32, p. 371-374, 2007.

- SALUNKHE, A. B.; KHOT, V. M.; PAWAR, S. H. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, 14, n. 5, 2014. 572-594.
- SCHETTINO JUNIOR, M. A. **Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo. [S.l.]. 2009.
- SCHETTINO JÚNIOR, M. A. **Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro**. Programa de Pós-Graduação em Física do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo. [S.l.]. 2009. (Tese).
- SCHULZ, P. A. Nanomateriais e a interface entre nanotecnologia e ambiente. **Rev. Vigilância Sanitária em Debate**, v. 1, n. 4, p. 53-58, 2013.
- SERNA, C. J.; MORALES, M. P. Maghemite (γ -Fe₂O₃): A versatile magnetic colloidal material. **Surface and Colloid Science**, Ed. E. Matijevic and M. Borkovec, **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, v. 17, n. 2, p. 27-81, 2013.
- SHARMA, M. et al. A systematic reconstruction and constraint-based analysis of Leishmania donovani metabolic network: identification of potential antileishmanial drug targets. **Molecular BioSystems**, Apr. 2017.
- SHI, S. et al. Tumor vasculature targeting and imaging in living mice with reduced graphene oxide. **Biomaterials**, v. 34, n. 12, p. 3002–3009, 2013.
- SHU, Z.; WANG, S. Synthesis and Characterization of Magnetic Nanosized Fe₃O₄/MnO₂ Composite Particles. **Journal of Nanomaterials**, 2009.
- SIDDIQUI, I. A. et al. Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 591-605, 2012.
- SILVA, A. C. et al. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment, 6, 2011. 591-603.
- SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.
- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 40, n. 2, 2004.

- SONG, X. et al. Biomimetic Modification and In Vivo Safety Assessment of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **J Nanosci Nanotechnol.**, 2016, v. 16, n. 4, p. 4100-7.
- SOUZA, A. T. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)**. Programa de Pós-graduação em Biofísica Molecular. UNESP. Dissertação de Mestrado. São José do Rio Preto/SP. 2011.
- SOUZA, K. C.; MOHALLEM, N. D. S.; SOUZA, E. M. B. Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicação em biomedicina. **Química Nova**, v. 34, n. 10, 2011.
- SOUZA, N. M. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de Co e Ni com aplicação em magneto hipertermia**. Programa de Pós-graduação em Física. UFRN. [S.l.]. 2015.
- SOUZA, R. M. et al. Reactivation of cutaneous and mucocutaneous tegumentary leishmaniasis in rheumatoid arthritis patients: an emerging problem? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 6, 2017.
- STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em Fisioterapia**. [S.l.]: Manole, 2001.
- SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. Q. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1252-1265, 2008.
- TECHNICAL COMMITTEE: ISO/TC 194. **Use of International Standard ISO 10993 - Biological evaluation of medical devices**. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. [S.l.]. 2013.
- TEIXEIRA, S. R. et al. Campos eletromagnéticos produzidos por equipamento de ondas curtas usados em fisioterapia: uma avaliação em Presidente Prudente/SP. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 5, n. 1, p. 35-40, 2001.
- THE ROYAL SOCIETY ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. **Nanoscience and nanotechnologies**, July 2004. Disponível em: <Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainhttp://www.nanotec.org.uk>. Acesso em: 12 maio 2016.
- THORAT, N. D. et al. Superparamagnetic iron oxide nanocargoes for combined cancer thermotherapy and MRI applications. **Phys Chem Chem Phys.**, Jul 2016.
- TONKOVIC, M.; BILINSKI, H. Glucose and glucuronic acid interactions with hydrolysed aluminium (III), v. 14, n. 8, p. 1025-1030, 1995.

- TUON, F. F. et al. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. **Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 442-446, 2008.
- VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica, origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.
- WAHAJUDDIN; ARORA, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 3445–3471, 2012.
- WANG, R.; BILLONE, P. S.; MULLETT, W. M. Nanomedicine in action: An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.
- WEINSTEIN, J. S. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 15-35, 2010.
- WOLF, E. L. **Nanophysics and nanotechnology**: an introduction to modern concepts in nanoscience. 3^a. ed. weinheim, Germany: Wiley-VHC, 2015.
- YE, X. et al. The thermal stability of nanocrystalline maghemite Fe₂O₃. **Journa lof Physics D: Applied Physics**, v. 31, p. 2739–2744, 1998.
- ZAVARIZE SF, M. A. M. S. S. E. Diatermia por ondas curtas: análise da temperatura corporal superficial por termografia. **Perspectivas online**, v. 12, n. 4, p. 35-47, 2014.
- ZHANG, J. P. et al. Herceptin directed nanoparticles activated by an alternating magnetic field selectively kill HER-2 positive human breast cells in vitro via hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 27, n. 7, p. 682-97, 2011.